

HELSINGIN YLIOPISTO

Elintarviketeknologian laitos

BEETAGLUKAANIN JA TÄRKKELYKSEN VUOROVAIKUTUKSET

Aino Kolmonen

Helsinki 2019

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Laitos/Institution– Department Elintarvike- ja ravitsemustieteiden osasto	
Tekijä/Författare – Author Aino Kolmonen			
Työn nimi / Arbetets titel – Title Beetaglukaaniin ja tärkkelyksen vuorovaikutukset			
Oppiaine / Läroämne – Subject Elintarviketeknologia (Viljateknologia)			
Työn laji/Arbetets art – Level Maisterintutkielma	Aika/Datum – Month and year Maaliskuu 2019	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 67	
<p>Tiivistelmä/Referat – Abstract</p> <p>Elintarvikkeiden komponenttien välillä olevat vuorovaikutukset voivat vaikuttaa elintarvikkeiden valmistusprosesseihin, säilyvyyteen ja terveysvaikutuksiin. Tärkkelys ja beetaglukaani molemmat sitovat vettä, ja niiden vaikutus gluteenittoman leivän rakenteen muodostumisessa on olennaista. Gluteenittoman leivän suurin haaste on rakenteen säilyminen paiston jälkeen, mikä aiheuttaa hävikkiä. Vuorovaikutuksien tuntemisen ansiosta prosessit voitaisiin optimoida niin, että gluteenittoman leivän rakenne säilyisi pidempään hyvänä. Kokeellisen työn tavoitteena oli selvittää reologisilla menetelmillä, onko tärkkelyksen ja beetaglukaaniin geeliytymisessä eroja, kun näiden muodostamien seosten kuumennusaikaa ja lämpötilaa vaihdeltiin. Vuorovaikutuksia tutkittiin mittaamalla seosten viskositeettia Rapid Visco Analyzerilla (RVA), ja geelien reologiaa mitattiin taajuuspyyhkäisymittauksella.</p> <p>Beetaglukaania sisältävän tärkkelysliuoksen RVA:lla saadun liisteröitymiskäyrän huippuviskositeetti ja loppuviskositeetti olivat korkeampia kuin ilman beetaglukaania valmistetun tärkkelysliuoksen. Beetaglukaania ja tärkkelystä sisältävillä geeleillä oli myös vahvempi rakenne kuin pelkästä tärkkelyksestä valmistetulla geelillä. Beetaglukaaniin ja tärkkelyksen liuottaminen yhdessä ei kuitenkaan johtanut vahvemman geelin muodostumiseen, kun liuosta kuumennettiin levyllä noin kahden tunnin ajan. Tutkimuksessa haluttiin tutkia tarkemmin sitä, miten liuotusaika ja -lämpötila vaikuttavat geelirakenteeseen. Kahden tunnin ajan 85 °C lämpötilassa liuotetun beetaglukaaniin ja gelatinoidun tärkkelyksen sekoituksesta valmistetun geelin ominaisuuksia vertailtiin 15 minuuttia korkeintaan 37 °C:ssa liuotetun beetaglukaaniin ja liisteröidyn tärkkelyksen sekoituksesta valmistettuun geeliin, ja havaittiin ettei beetaglukaaniin parempi liukeneminen johtanut vahvemman geelin muodostumiseen. Tutkimuksen tulokset viittasivat siihen, että laimean beetaglukaaniinliuoksen geeliytymisen taustalla on osittainen liukeneminen, mikä on todistettu jo aiemmissa tutkimuksissa. Tutkimuksen tuloksien soveltamisesta gluteenittoman leivän valmistuksessa voitaisiin saada hyötyä, kun rakenne säilyisi hyvänä pidempään prosessien optimoinnin seurauksena.</p>			
<p>Avainsanat – Nyckelord – Keywords</p> <p>Tärkkelys, beetaglukaani, vuorovaikutus, viskositeetti, geeli</p>			
<p>Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited</p> <p>Helsingin yliopiston digitaalinen arkisto, Helda</p>			
<p>Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information</p>			

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Faculty of Agriculture and Forestry		Laitos/Institution– Department Department of Food and Nutrition
Tekijä/Författare – Author Aino Kolmonen		
Työn nimi / Arbetets titel – Title Interactions of betaglucan and starch		
Oppiaine /Läroämne – Subject Food Technology (Cereal Technology)		
Työn laji/Arbetets art – Level M. Sc. Thesis	Aika/Datum – Month and year March 2019	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 67
<p>Tiivistelmä/Referat – Abstract</p> <p>The interactions between food components can affect the processes used in food industry, the self-life of products and the health effects of food. Starch and betaglucan are hydrocolloids that can absorb water, and their effect on the structure of gluten-free bread is essential. The biggest challenge in gluten-free baking is the rapid stiffening of the crumb after baking which is called staling. Staling causes big losses. The aim of the study was to find out if there are interactions between betaglucan and starch and if there is then also find out what are the interactions like. If the interactions were known, the baking processes could be optimized to keep bread softer for longer time.</p> <p>In this work solutions of betaglucan, starch and combinations of both were prepared with RVA and on heating plate at different temperatures and dissolution times. The gels were prepared of these solutions storing the samples in molds at +5 °C for 20 hours. The storage modulus G' and loss modulus G'' were measured with a range of shear rates.</p> <p>In RVA higher viscosity was measured in samples containing both starch and betaglucan compared to samples containing starch or betaglucan only. The starch gels containing betaglucan were stronger than the gels without betaglucan. Stronger gel also resulted when the betaglucan and starch were dissolved separately and then mixed together compared to the starch gel. The gel prepared with RVA heating the solution of starch and betaglucan for 13 minutes had stronger structure than gel prepared of starch and betaglucan on heating plate for two hours. When gel prepared of betaglucan dissolved for 2 hours at 85 °C and mixed with gelatinized starch was compared to a gel prepared of betaglucan dissolved for 15 minutes at maximum of 37 °C and mixed with gelatinized starch no stronger gel resulted. The results suggest that gelation of betaglucan in low concentrations happens through partial dissolution which has been shown in earlier studies. The results could help in planning better baking processes for gluten-free bread and longer self-life as consequence of optimizing the process.</p>		
<p>Avainsanat – Nyckelord – Keywords</p> <p>Starch, beta-glucan, interaction, viscosity, gel</p>		
<p>Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited</p> <p>The Digital Repository of University of Helsinki, Helda</p>		
<p>Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information</p>		

SISÄLLYSLUETTELO

TIIVISTELMÄ	4
ABSTRACT	5
ESIPUHE	6
1 JOHDANTO	7
2 KIRJALLISUUSKATSAUS	9
2.1. Beetaglukaani	9
2.1.1 Beetaglukaanin rakenne	9
2.1.2 Prosessoinnin vaikutus beetaglukaanin molekyylikokoon	10
2.1.3 Beetaglukaanin uuttaminen	11
2.1.4 Beetaglukaanin aggregoituminen	12
2.1.5 Beetaglukaanin ominaisuuksien hyödyntäminen	13
2.1.5.1 Beetaglukaanin terveysvaikutukset	13
2.2 Tärkkelys	14
2.2.1 Tärkkelyksen rakenne	14
2.2.2 Tärkkelyksen hydrolysoituminen	16
2.2.3 Tärkkelys elintarvikkeissa	17
2.2.4 Kauratärkkelyksen ominaisuudet	18
2.2.5 Kauratärkkelyksen eristäminen kaurajauhosta	18
2.3 Beetaglukaanin ja tärkkelyksen reologia	19
2.3.1 Reologia yleisesti	19
2.3.2 Beetaglukaanin reologia	20
2.3.3 Tärkkelyksen reologia	22
2.4 Beetaglukaanin ja tärkkelyksen vuorovaikutusten tutkiminen	24
2.4.1 Aiemmat vuorovaikutuksia käsitelleet tutkimukset	24
2.4.2 Vuorovaikutuksien tutkimiseen soveltuvia menetelmiä	26
2.4.2.1 Fluoresenssimikroskopia	26
2.4.2.2 RVA	27
2.4.2.3 Oskilloiva reologinen mittaus	28
2.4.2.4 Vuorovaikutuksien tutkiminen faasiseparaation kautta	29
3 KOKEELLINEN TUTKIMUS	31
3.1 Materiaalit ja menetelmät	31
3.1.1 Materiaalit	31

3.1.2 Menetelmät	31
3.1.2.1 Beetaglukaanin uuttaminen kauralesekonsentraatista	31
3.1.2.2 Tärkkelyksen eristäminen kauraydinjauhosta	32
3.1.2.3 Geelien valmistus	34
3.1.2.4 Geeliominaisuuksien tutkiminen	37
3.2 Tulokset	37
3.2.1 Kauraydinjauhon ja kauratärkkelyksen viskositeetit sekä geelien viskoelastiset ominaisuudet	37
3.2.2 Vehnä- ja kauratärkkelysnäytteiden geeliytymiserot	39
3.2.3 Beetaglukaanin vaikutus viskositeettiin ja geeliin	41
3.2.4 Beetaglukaanin liuotusajan vaikutus	44
3.2.5 Beetaglukaanin ja tärkkelyksen liuotus yhdessä ja erikseen	45
3.2.6 Etanolin vaikutus liuoksien viskositeettiin ja geelien ominaisuuksiin	46
3.2.7 Liuotusajan vaikutus geeliin	49
3.2.8 Partikkeleiden vaikutus geeliin	50
3.3 Pohdinta	52
3.3.1 Kauraydinjauhon puhdistamisen vaikutus viskositeettiin	52
3.3.2 Vehnätärkkelyksen ja kauratärkkelyksen erojen vaikutus viskositeettiin	52
3.3.3 Beetaglukaanin vaikutus tärkkelysliuoksien viskositeettiin	53
3.3.4 Beetaglukaanin ja tärkkelyksen vuorovaikutuksien merkitys geelissä	54
3.3.5 Partikkeleiden vaikutus geeliin	55
3.3.6 Etanolin vaikutus viskositeettiin ja geelin ominaisuuksiin	55
3.3.7 Beetaglukaanin liuottamiseen käytetyn ajan vaikutus	56
3.3.8 Tutkimuksen tulosten merkitys	56
4 PÄÄTELMÄT	58
5 LÄHTEET	59
LIITTEET	66

ESIPUHE

Työn kokeellinen osuus tehtiin Helsingin yliopiston elintarvike- ja ravitsemustieteiden osaston viljateknologian laboratorioissa. Työtä ohjasivat Noora Mäkelä, Yujie Wang ja Tuula Sontag-Strohm. Työn valvojana toimi Kati Katina.

Haluan kiittää ohjaajiani Noora Mäkelää, Yujie Wangia ja Tuula Sontag-Strohmia ohjaamisesta, neuvoista ja tuesta, sekä Outi Brinckä kaikesta avusta. Lämmin kiitos myös Raisio Oyj:lle tutkimusmateriaalien tarjoamisesta.

Erityiskiitos perheelleni ja ystävilleni, joita ilman en olisi tässä.

Helsingissä 14.3.2019

Aino Kolmonen

1 JOHDANTO

Nykyaikaisen länsimaisen ruokavalion, jossa nopeasti pilkkoutuva tärkkelystä saadaan ylimäärin, on todettu johtavan erilaisiin sairauksiin, kuten korkeaan kolesteroliin, tyypin 2 diabetekseen ja ylipainoon (Feng ym 2015, Villegas ym. 2007, Brand-Miller ym. 2002). Tärkkelystä saadaan runsaasti esimerkiksi viljoista. Tärkkelys muodostaa vedessä kuumennettuna geelimäisen rakenteen, jota hyödynnetään monin tavoin niin elintarviketeollisuudessa kuin muillakin teollisuuden aloilla (Ashogbon ja Akintayo 2014, Burrell 2003).

Kiinnostus kauraa kohtaan ihmisen ravintona on lisääntynyt eri puolilla maailmaa viime vuosina. Suurimpana syynä ovat kauran sisältämän beetaglukaanin terveysvaikutukset. Kauran terveysvaikutukset perustuvat suurelta osin beetaglukaanin kykyyn muodostaa viskooseja liuoksia (Mäkeläinen ym. 2007, Mälkki ja Virtanen 2001, Othman 2011). Beetaglukaanin tuottamiin terveysvaikutuksiin lukeutuu muun muassa verensokerin tasoittuminen ja kolesteroliarvojen paraneminen.

Elintarvikkeiden terveysvaikutuksien kannalta ei ole merkityksetöntä, miten elintarvikkeet on prosessoitu, ja mitä vuorovaikutuksia elintarvikkeiden komponenttien välillä on joko valmistuksen aikana tai ruuansulatuskanavassa (Johansson ym. 2007, Brennan 2004, Izydorczyk ym. 2005). Hydrokolloidien väliset vuorovaikutukset muuttavat komponenttien käyttäytymistä verrattuna siihen, miten ne käyttäytyvät ilman toista hydrokolloidia (Gao ym. 2017). Vuorovaikutukset voivat muuttaa elintarvikkeen rakennetta, säilyvyyttä ja toiminnallisia ominaisuuksia. Tärkkelyksen vuorovaikutuksia proteiinien kanssa on tutkittu laajasti (Jamilah ym. 2009). Proteiinien ja tärkkelyksen vuorovaikutukset perustuvat usein elektrostaattisiin ominaisuuksiin, jotka aiheuttavat joko molekyylien välillä vetovoimaa tai hylkimistä (Jamilah ym 2009, Tolstoguzov 2003). Vetovoima molekyylien välillä saa aikaan kompleksinmuodostusta, kun taas hylkiminen johtaa faasien separoitumiseen. Tärkkelyksen vuorovaikutuksista toisen polysakkaridin kanssa on tehty useita tutkimuksia. Esimerkiksi galaktomannaanilla on todettu olevan vuorovaikutuksia tärkkelyksen kanssa (Alloncle ym. 1989). Galaktomannaania ja tärkkelystä sisältävän suspension viskositeetin havaittiin olevan huomattavasti suurempi kuin pelkkää galaktomannaania tai tärkkelystä sisältävän näytteen.

Tärkkelyksen vuorovaikutuksia myös beetaglukaanin kanssa on tutkittu aiemmin. Brennan (2004) havaitsi laajassa tutkimuskokonaisuudessaan, että 5 % beetaglukaania vaikutti huomattavasti tärkkelystä sisältävän liuoksen fysikaalisiin ominaisuuksiin. Beetaglukaanin kilpailu veden absorboimisesta tärkkelyksen kanssa johti siihen, että tärkkelys absorboi

vähemmän vettä, kuin kontrollinäytteessä, jolloin viskositeetti jäi pienemmäksi. Leivässä sekä pastassa *in vitro* -kokeissa tärkkelyksen pilkkoutuminen glukoosiksi väheni beetaglukaanin lisäämisen seurauksena. Izydorczyk ym. (2005) puolestaan havaitsi, että lisäämällä ohrajauhoja nuudeleihin saatiin aikaan terveystaakatuksiltaan parempi elintarvike, mutta myös aistinvaraiset ominaisuudet säilyivät hyvinä. Lin ym. (2016) tärkkelyksen ja beetaglukaanin vuorovaikutuksia kartoittavassa tutkimuksessa haluttiin selvittää beetaglukaanin mahdollisuuksia osana terveellistä elintarviketta. Tutkimusten tulosten perusteella arvioitiin, että ohran beetaglukaani edistää vehnätärkkelysjuvästen liisteröitymistä, ja näin ollen ryhmän tulokset tukevat teoriaa vuorovaikutuksista beetaglukaanin ja tärkkelyksen välillä. Beetaglukaanin ja tärkkelyksen vuorovaikutuksia koskevien tutkimusten tulokset ovat ainakin osittain ristiriitaisia, eikä vuorovaikutusmekanismia ole vielä selvitetty. Myös vuorovaikutusten seurauksia tunnetaan heikosti, joten tarvetta tutkimukselle on.

Kirjallisuuskatsauksen tavoitteena oli aiemman tutkimuksen pohjalta ymmärtää tärkkelyksen ja beetaglukaanin ominaisuuksia ja niiden tutkimista, sekä ymmärtää niiden mahdollisia vuorovaikutuksia. Lisäksi kirjallisuuskatsauksessa perehdyttiin reologiaan, fluoresenssimikroskopiaan ja faasien erottumiseen. Kokeellisen työn tavoitteena oli löytää reologisilla menetelmillä eri tavoin valmistetuista tärkkelystä ja beetaglukaania sisältävistä näytteistä eroja, jotka voisivat olla seurausta niiden välisistä vuorovaikutuksista.

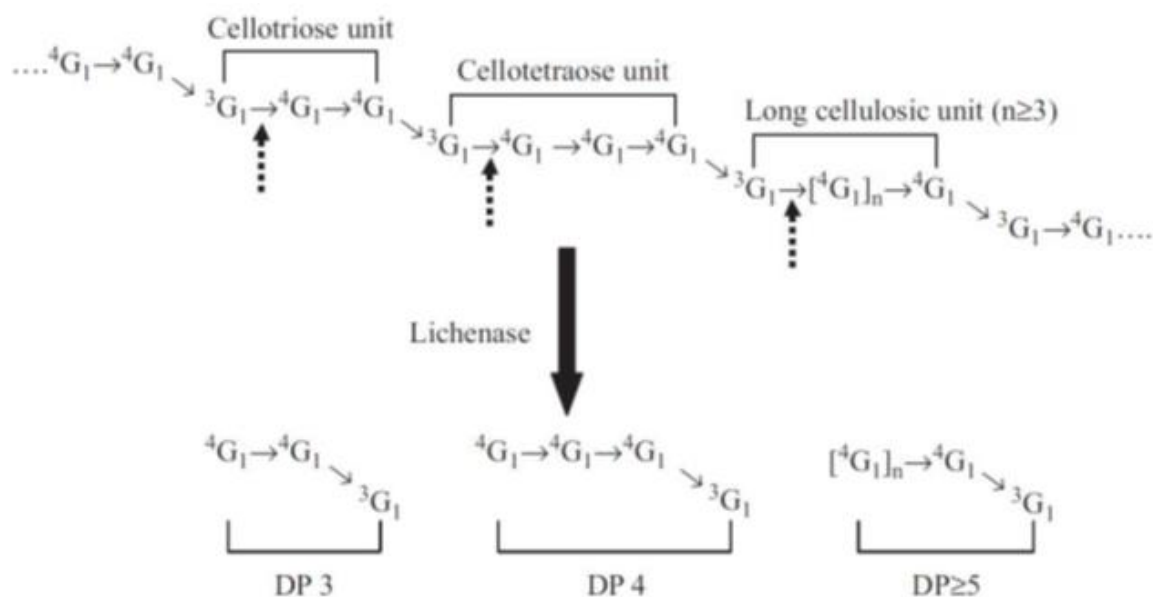
2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 Beetaglukaani

Beetaglukaani on D-glukopyranosyyliyksiköistä rakentunut lineaarinen polysakkaridi (Brennan ja Cleary 2005). Tässä tutkimuksessa keskityttiin vain viljojen beetaglukaaniin, jota esiintyy erityisesti ohrassa ja kaurassa. Kaurassa beetaglukaania on havaittu suuria pitoisuuksia tärkkelysendospermin kerroksissa lähimpänä alkiota, alkiossa ja subaleuronikerroksessa eri paikoissa lajikkeesta riippuen (Miller ja Fulcher 1994). Ohrassa beetaglukaani on levittäytyneenä tasaisemmin eri lajikkeilla, suurin määrä on sijoittunut tärkkelysendospermiin. Kaurassa beetaglukaaniin määrä on 3-7 % ja ohrassa 3-11 % (Skendi ym. 2003).

2.1.1 Beetaglukaaniin rakenne

Viljan beetaglukaaniin (tästä eteenpäin tähän viitataan termillä beetaglukaani) glukoosiyksiköt ovat liittyneet toisiinsa β -(1-4) -sidoksin tri- ja tetrameereiksi, joiden välissä on yksittäisiä β -(1-3) -sidoksia (Kivelä 2011, Johansson 2006). β -(1-3) -sidokset lisäävät ketjun taipuisuutta ja tekevät molekyylistä vesiliukoisen (Buliga ym. 1986). β -(1-3) -sidoksien erottamia kolmen ja neljän glukoosiyksikön ketjuja kutsutaan sellotriooseiksi (DP3) ja sellotetraooseiksi (DP4) (Lazaridou ja Biliaderis 2007, Parrish ym. 1960). Pidempiäkin oligomeereja ($DP \geq 5$) on beetaglukaaneissa, mutta sellotrioosit ja sellotetraosit ovat yleisempiä, sillä ohran beetaglukaaniin sellotrioosien osuus on 52 - 69 % ja kauran beetaglukaaniin 34 - 41 %. Sellotrioosien määrän suhdetta sellotetraosien määrään ($DP3:DP4$) käytetään kuvaamaan eri beetaglukaaniin rakenteita toisistaan (Kivelä 2011). DP3- ja DP4-segmentit voidaan erottaa likkenaasientsyymien avulla, jolloin voidaan tutkia beetaglukaaniin rakenne-eroja. Likkenaasi on (1-3)(1-4)- β -D-glukaani-4-glukanohydrolaasi (EC 3.2.1.73), joka pilkkoo β -(1-3) -sidoksista seuraavia β -(1-4)-glykosidisia sidoksia (kuva 1) (Hrmova ja Fincher 2001). Korkeampi $DP3:DP4$ suhde kertoo useammista DP3 segmenteistä, joten myös β -(1-3) -sidoksia on enemmän (Johansson ym. 2004). $DP3:DP4$ -suhde vehnällä on 3,7; ohralla 2,8 - 3,0; ja kauralla 2,1 (Moschakis ym. 2014). Myös vesiliukoisten ja -liukenemattomien beetaglukaaniin $DP3:DP4$ -suhteessa on pieniä eroja.



Kuva 1. β -(1-3) -sidoksista seuraavia β -(1-4)-glykosidisia sidoksia voidaan pilkkoa likkenaasin avulla, jolloin saadaan DP3, DP4 ja DPn -yksiköitä (Lazaridou ja Biliaderis 2007). Näin voidaan tutkia esimerkiksi eri lähteistä eristettyjen beetaglukaanien välisiä rakenne-eroja.

Kauran beetaglukaanin molekyylipaino on lähteestä riippuen $0,065 - 3 \times 10^6$ g/mol ja ohran $0,15 - 2,5 \times 10^6$ g/mol (Brennan ja Cleary 2005). Lazaridoun ja Biliaderiksen (2007) mukaan molekyylipainon vaihtelun syitä ovat lajike, kasvuympäristö, uuttamiseen käytetty menetelmä, kuten liuotin ja lämpötila, puhdistaminen, aggregoituminen ja depolymerisaatio. Johansson ym. (2004) tutkivat HPSEC -menetelmällä (high performance size exclusion chromatography, suuren erotuskyvyn kokoeksklusiokromatografia) kauran ja ohran liukoisten ja liukenemattomien beetaglukaanien molekyylipainoja. Vesiliukoisten beetaglukaanien molekyylipaino oli 500 000 g/mol ja ei-vesiliukoisten alle 200 000 g/mol. Toisaalta Johanssonin (2006) mukaan täysjyvistä saadun beetaglukaanin molekyylipainon on todettu olevan paljon matalampi kuin leseestä peräisin olevan. Erojen todettiin johtuvan eroista molekyyliliä pilkkovien entsyymien määrissä, koska lese on darrekäsitelty, mutta täysjyvänäytettä ei oltu lämpökäsitelty. Darrekäsittelyllä tarkoitetaan lämpöä ja kosteutta hyödyntävää käsittelyä, jonka ensisijaisena tarkoituksena on inaktivoida lipidejä hydrolysoivia entsyymejä (Lehtinen ja Kaukovirta-Norja 1986).

2.1.2 Prosessoinnin vaikutus beetaglukaanin molekyylikokoon

Beetaglukaani voi pilkkoutua muun muassa entsyymien vaikutuksesta, happohydrolyysin takia tai hapettumalla (Kivelä ym. 2009). Pilkkoutuminen voi heikentää beetaglukaanin

terveysvaikutuksia, ja se muuttaa beetaglukaanin reologiaa sekä heikentää beetaglukaanin muodostaman rakenteen pysyvyyttä (stability).

Jaskarin ym. (1995) mukaan kauraleseiden beetaglukaanin molekyylipaino säilyi muuttumattomana lämpö- ja α -amylaasikäsittelyistä huolimatta. Åman ym. (2004) selvittivät kauran beetaglukaanin molekyylipainon muuttumista useissa eri tuotteissa. Heidän tutkimuksissaan havaittiin beetaglukaanin molekyylipainon säilyvän hyvin kuivaprosessoinnissa. Tutkimuksessa leivän beetaglukaanin todettiin pilkkoutuneen runsaasti leivonnan aikana, ja tämän pääteltiin aiheutuneen vehnäjauhojen tai hiivan sisältämien beetaglukanaasien toiminnasta. Merkittävintä pilkkoutumista huomattiin olevan pieneksi leikatulla leseellä, pitkän fermentaatioajan yhteydessä ja leivässä, johon oli lisätty hapantaikinaa. Myös tuorepastan valmistusprosessissa esiintyi beetaglukaanin pilkkoutumista. Andersson ym. (2004) tutkivat ohran beetaglukaanin pilkkoutumista taikinassa ja leivässä. Heidän tuloksensa olivat samansuuntaisia Åmanin ym. (2004) tulosten kanssa fermentaation vaikutuksesta beetaglukaanin pilkkoutumiseen. Lisäksi Andersson ym. (2004) suosittelivat sekoitusajan minimointia beetaglukaanin pilkkoutumisen ehkäisemiseksi.

2.1.3 Beetaglukaanin uuttaminen

Uuttamismenetelmällä on vaikutusta uutetun beetaglukaanin fysikokemiallisiin ja toiminnallisiin ominaisuuksiin (Ahmad ym. 2010). Bhattyn (1992) mukaan uuton pH:lla oli vaikutusta viskositeettiin ja uutettavan beetaglukaanin määrään. Uuton pH:n ja uutetun beetaglukaanin molekyylikoon välillä olevan suhteen todettiin olevan epäselvä niin kauralla kuin ohrallakin. Saantoon on todettu olevan vaikutusta uuttomenetelmällä ja etenkin uuttoon käytetyillä liuottimilla sekä lämpötilalla (Johansson 2006). Izydorczyk ym. (1998) tutki emäsluokoisten beetaglukaanien ominaisuuksia ja vertaili niitä vesiliukoisiin beetaglukaaneihin. Emäsluokoisissa beetaglukaaneissa todettiin olevan enemmän β -(1 \rightarrow 4) -sidoksia, pidempiä ketjuja, joissa vain β -(1 \rightarrow 4) -sidoksia, ja DP3/DP4 suhteen olevan suurempi kuin vesiliukoisissa beetaglukaaneissa. Syynä eroihin vesi- ja emäsuutettujen beetaglukaanien rakenteisiin arveltiin olevan siinä, että kyseiset rakenteet ovat huonosti veteen liukenevia. Burkus ja Temelli (2005) käyttivät tutkimuksissaan emäsuuttoa beetaglukaanin erottamiseksi. Prosessin alussa käytettiin pH-arvoa 9,4 ja lämpötilaa 53 – 55 °C, sitten tärkkelys erotettiin, liuos keitettiin beetaglukaanin stabiloimiseksi. Proteiinit sakkautettiin happokäsittelyllä, ja lopulta beetaglukaani saostettiin etanolilla. Kun

käsittelyyn käytettiin eri laitteistoa ja pidempi aika jokaisen vaiheen suorittamiseen, saatiin puhtaampaa lopputuotetta ja pienempi saanto.

Ahmad ym. (2010) vertailivat kolmen erilaisen uuttomenetelmän vaikutuksia kauran beetaglukaanin ominaisuuksiin. Entsymaattisella uutolla oli paras saanto ja vähiten epäpuhtauksia (tärkkelys, rasva, pentosaanit). Tutkijoiden mukaan entsyymaattisen uuton saannon suuruus oli seurausta erityisesti proteiinien ja tärkkelyksen tehokkaammasta pilkkoutumisesta, ja edellä mainittujen epäpuhtauksien sekä molekyylien välisten assosiaatioiden vähenemisestä. Toiseksi suurin saanto oli emäksisellä uutolla ja pienin happouutolla. Myös Gamel ym. (2014) havaitsivat entsyymikäsittelyjen positiivisen vaikutuksen uuton saantoon. Eniten vaikutusta havaittiin pankreatiinin ja α -amylaasin lisäämisellä. Syynä suurempaan saantoon arveltiin olevan beetaglukaanin parempi liukeneminen.

Myös elintarvikkeen prosessointimenetelmien vaikutuksia beetaglukaanin uuttuvuuteen on tutkittu. Johanssonin (2006) tutkimuksissa keittäminen (cooking) lisäsi liukoisen beetaglukaanin määrää, kun taas paistaminen (baking) vähensi. Näin ollen beetaglukaanin terveysvaikutusten kannalta keittäminen näyttäisi olevan paistamista parempi prosessointimenetelmä.

2.1.4 Beetaglukaanin aggregoituminen

Ohran beetaglukaanista noin 25 % on veteen liukenematonta ja kauran beetaglukaanista 18 % (Johansson 2006). Izydorczyk ym. (1998) havaitsivat tutkimuksissaan suuren DP3:DP4 suhteen vähentävän vesiliukoisuutta. Ilmiön taustalla arveltiin olevan DP3 -yksiköiden välisten vetysidoksien aiheuttamien aggregaattien muodostuminen. DP3 -yksiköiden välisiä sidoksia käsitellään myös reologia-osiossa, jossa sidokset liittyvät geelirakenteen muodostumiseen. Aggregoitumisella tarkoitetaan molekyylien sitoutumista toisiinsa heikoilla tai vahvoilla sidoksilla, mikä johtaa suurempien ryppäiden muodostumiseen (Corezzi ym 2012). Sidokset voivat olla fysikaalisia, jolloin aggregoituminen on palautuvaa, tai ne voivat olla kemillisiä, jolloin aggregoituminen on palautumatonta. Vårum ym. (1992) raportoivat misellimäisten labiilien aggregaattien muodostumisesta. Vain pieni osa beetaglukaanimolekyyleistä osallistui aggregaattien muodostumiseen. Tässä tapauksessa labiililla tarkoitetaan sitä, että aggregoituneet molekyylit eivät erotu muista aggregaatteihin osallistumattomista molekyyleistä koska aggregaattien hajoamista tapahtuu jatkuvasti. Syyksi ehdotettiin negatiivista varausta, joka voi johtua pitkästä yhtenäisestä β -(1 \rightarrow 4) -

sidoksilla sitoutuneesta osiosta tai molekyyliin liittyneistä lipideistä. Aggregoituminen saattaisi tutkijoiden mukaan olla beetaglukaanin myönteisten fysiologisten vaikutusten taustalla. Li ym. (2011) totesivat aggregoitumisen olevan dynaaminen tasapainoreaktio. Tutkimuksessa havaittiin myös, että isommat molekyylit muodostivat pienempiä aggregaatteja, mikä selittyy diffuusion hidastumisella molekyylien kasvaessa. Aggregoituminen voi vaikeuttaa molekyylipainon tarkkaa määrittämistä (Mäkelä ym. 2015). Ohran beetaglukaaniaggregaatteja on pystytty pilkkomaan natriumhydroksidin avulla vaikuttamatta beetaglukaanin molekyylipainoon (Ulmus ym. 2012). Aggregoitumisesta puhutaan välillä geeliytymistä edeltävänä vaiheena, mutta edellä kuvattu aggregoituminen ei johda geeliytymiseen aggregaattien jatkuvan pilkkoutumisen vuoksi (Tosh ym. 2003, Li ym. 2011)

2.1.5 Beetaglukaanin ominaisuuksien hyödyntäminen

Elintarviketeollisuudessa beetaglukaania hyödynnetään sen viskositeettia lisäävän ominaisuuden ja geeliytymisen vuoksi. Beetaglukaanin avulla voidaan säädellä elintarvikkeen suutuntumaa ja ulkonäköä (Lazaridou ja Biliaderis 2007). Myös rasvaa voidaan korvata beetaglukaanilla valmistettaessa vähärasvaisia tuotteita. Beetaglukaania kutsutaan funktionaaliseksi elintarvikkeeksi, koska se on elintarvike, jolla on terveysvaikutuksia.

2.1.5.1 Beetaglukaanin terveysvaikutukset

Beetaglukaanin on todettu alentavan plasman kolesteroliarvoja (Othman 2011). FDA:in (Food and Drug Administration) (1997) mukaan 3 g beetaglukaania päivässä vähentää sydän- ja verisuonisairauksien todennäköisyyttä. Vaikutuksen arvellaan johtuvan beetaglukaanin kyvystä nostaa ruokasulan viskositeettia ja siten vähentää ruuasta imeytyvän kolesterolin määrää ja toisaalta estää sappihappojen takaisinimeytymistä (Othman 2011). Kun sappihappojen takaisin imeytyminen suolistosta vähenee, elimistö syntetisoi uusia sappihappoja veren kolesterolista, ja kolesterolin määrä veressä vähenee. Mahalaukun sisällön viskositeetti suurenee beetaglukaanin sitoessa nestettä ja mahalaukun tyhjeneminen hidastuu, mikä lisää kylläisyyden tunnetta (Mälkki ja Virtanen 2001). Viskositeetin suurenemisen seurauksena ravintoa pilkkovien entsyymien toiminta saattaa hidastua, ja siten myös ruokasulan liikkuminen hidastuu ohutsuolessa. Ruokasulan saavuttaessa paksusuolen

mikrobit pystyvät fermentoimaan sulamattomia kuituja, ja fermentoitumisen seurauksena paksusuolen syövän riski voi laskea. Ihan selvää ei kuitenkaan ole, onko seuraus juuri liukoisen kuidun ansiota. Suolen mikrobien kasvu edistää typen sitomista ja erittymistä ulosteeseen, mikä vähentää munuaisten kuormittumista, koska muutoin typpi kulkeutuisi munuaisten kautta virtsan mukana pois elimistöstä. Beetaglukaanin fermentoitumisen seurauksena suolistoon erittyy lyhytketjuisia rasvahappoja, joiden vaikutuksen seurauksena ylimääräisen nesteen ja natriumin absorboituminen lisääntyy, millä on merkitystä ripulin hoidossa. Lyhytketjuiset rasvahapot voivat olla ummetuksenkin oireiden helpottumisen taustalla normalisoimalla ulosteen rakennetta ja suoliston liikkeitä.

Mäkeläinen ym. (2007) osoittivat tutkimuksissaan, että beetaglukaani laskee glykeemistä indeksii. Ruuansulatus hidastui ja verensokeritaso pysyi tasaisempana beetaglukaania sisältävän aterian jälkeen kuin kontrolliryhmällä. Beetaglukaanin positiivinen vaikutus perustuu liukoisen beetaglukaanin viskositeettia lisäävään ominaisuuteen. Kwong ym. (2013) selvittivät suurimolekyyllipainoisen ja pienimolekyyllipainoisen beetaglukaanin vaikutusta glykeemiseen vasteeseen sekä geelinä että juomassa ei-geeliytyneenä. Tutkimuksissa selvisi, että etenkin pienimolekyyllipainoisen beetaglukaanin geelirakenne itsessään ei ole tehokas madaltamaan glykeemistä indeksii *in vivo*, vaan ruokasulan sekoittumisen väheneminen sekä mahalaukun tyhjenemisen hidastuminen ovat tärkeämpiä syitä glykeemisen vasteen paranemiselle.

2.2 Tärkkelys

Tärkkelys toimii kasvin energiavarastona (Copeland ym. 2009). Tärkkelystä löytyy esimerkiksi viljojen ja palkoviljojen endospermistä, juurimukuloista ja joistain raaoista hedelmistä (Raigond ym. 2015). Kehityksessa ihmisen ravinnon energiasta jopa 80 % voi olla peräisin tärkkelyksestä, ja sen lähteenä ovat yleensä maissi, riisi, vehnä tai peruna (Burrell 2003).

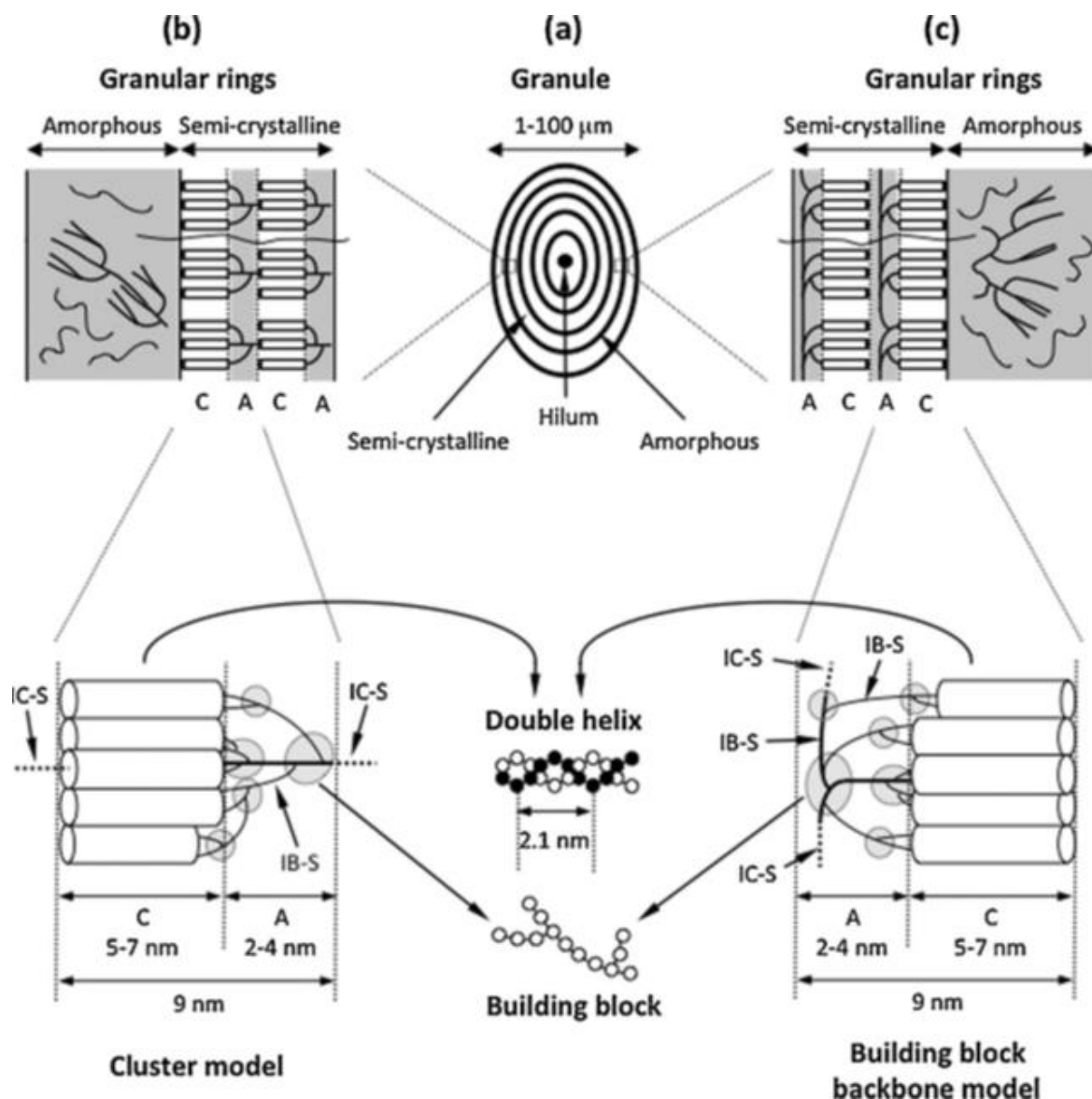
2.2.1 Tärkkelyksen rakenne

Tärkkelys koostuu kahdesta polymeeristä, amyloosista ja amylopektiinistä (Copeland ym. 2009). Amyloosissa D-pyranosyyliyksiköt ovat kiinnittyneet toisiinsa α -1 \rightarrow 4 -sidoksin muodostaen lineaarisen rakenteen. Amylopektiinissä puolestaan D-glukopyranosyyliyksiköt ovat sitoutuneet α -1 \rightarrow 6 -sidoksin, jolloin rakenne on erittäin haarautunut. Amyloosi

muodostuu 900 - 3300 glukoosiyksiköstä ja amylopektiini 4800 – 15900 glukoosiyksiköstä (Vamadevan ja Bertoft 2015). Amyloosin molekyylipaino on noin 32400 – 113400 g/mol, ja amylopektiinin on noin 10^7 - 10^9 g/mol (Tester ym. 2004).

Amyloosi esiintyy usein yksöiskierteenä, mutta myös kaksoiskierrettä ja vapaita polymeerejä on havaittu (Gunaratne ja Corke 2004). Yksöiskierre on sisältä hydrofobinen, ja sitoo lipidejä sisäänsä. Amylopektiinin ketjut jaotellaan A, B ja C-ketjuihin substituotumisensa mukaan. A-ketjuissa ei ole substituutiota, B-ketjuihin on substituotunut muita ketjuja ja C-ketjuissa on pelkistävä glukoosi (Copeland ym. 2009). Amyloosia on useimpien kasvien tärkkelyksessä 60 – 90 %. Toisaalta joidenkin lajikkeiden amylopektiinin osuus voi olla jopa lähes 100 %, jolloin puhutaan vahatärkkelyksestä. Amylopektiinin ketjujen pituudet suhteessa toisiinsa vaikuttaa amylopektiinin muotoon, ja amylopektiinin muoto taas vaikuttaa tärkkelysylvästen pakkautumiseen. Amyloosin määrän suhde amylopektiinin määrään on suorassa yhteydessä tärkkelyksen viskositeettiin, liisteröitymiseen, liukoisuuteen, geelin pysyvyyteen, geelin rakenteeseen, uuskiteytymiseen ja geelin vahvuuteen. Amyloosimäärän kasvaessa geelin kiinteys lisääntyy ja tahmeus vähenee.

Käsittlemättömänä tärkkelys on pakkautuneena jyväsiin (kuva 2). Tärkkelysylvästen koko ja muoto vaihtelevat suuresti eri kasvilajeilla (Gunaratne ja Corke 2004). Jyvästen koolla on havaittu olevan yhteys tärkkelyksen makuun ja suutuntumaan. Tärkkelysylväsissä on kiteisiä ja amorfisia alueita, jotka vaihtelevat kerroksittain (Gunaratne ja Corke 2004, Copeland ym. 2009). Kerrosten väli on noin 9-11 nm. Kiteiset alueet ovat amorfisia alueita tiheämpiä, amorfiset alueet ovat alttiimpia hydrolyysille, kuten myös pienet tärkkelysylväset ja huokoiset tärkkelysylväset (Gunaratne ja Corke 2004).



Kuva 2. Tärkkelyksen amyloosi- ja amylopektiiniketjujen asettuminen kiteisiin ja amorfisiin alueisiin tärkkelysjuväsissä. Amylopektiinin haarautumiskohdat muodostavat kiteiset alueet, ja kiteiset alueet muodostavat renkaita. Renkaiden väli on noin 9 nm. (Vamadevan ja Bertoft 2015).

2.2.2 Tärkkelyksen hydrolysoituminen

Tärkkelystä hydrolysoivista entsyymeistä tärkein on α -amylaasi, joka pilkkoo α -(1,4)-glykosidisia sidoksia (Copeland ym. 2009). α -(1,6)-glykosidisia sidoksia pilkkovat amyloglukosidaasi ja isoamylaasi. Kasveista ja eläinten syljestä löytyvän α -amylaasin lisäksi myös mikro-organismit pystyvät muodostamaan α -amylaasia (Kandra 2003). Amylaasin pilkkoutumistuotteita ovat glukoosi, maltoosi ja maltotrioosi (Araujo ym. 2004).

Amylaasia valmistetaan pääasiassa mikro-organismien avulla teollisuuden käyttöön (Souza ja Oliveira e Magalhaes 2010). Mikro-organismien tuottamien amylaasin valmistuksessa etuna on olosuhteiden helppo manipuloiminen ja tuotettavan entsyymin hyvä pysyvyys.

Kaupallisia entsyymejä käytetään samoihin teollisuuden tarkoituksiin, kuin tärkkelystäkin. Tärkeimpiä ovat elintarviketeollisuus, tekstiilien ja paperin valmistus sekä puhdistusaineet.

2.2.3 Tärkkelys elintarvikkeissa

Tärkkelystä hyödynnetään teollisuudessa monin eri tavoin (Ashogbon ja Akintayo 2014). Elintarviketeollisuudessa muunneltua tärkkelystä käytetään muun muassa paksuntajana ja sitojana. Suurin osa elintarviketeollisuudessa käytettävästä tärkkelyksestä jalostetaan siirapiksi (Burrell 2003). Prosessoiduissa lihatuotteissa tärkkelyksen avulla tuotteeseen saadaan tekstuuria, ja tuotteen stabiilisuutta voidaan parantaa. Muita esimerkkejä elintarvikkeista, joissa hyödynnetään tärkkelyksen ominaisuuksia, ovat majoneesi, vauvan ruuat, juomat ja konvehdit. Elintarviketeollisuuden lisäksi tärkkelys on tärkeä raaka-aine esimerkiksi lääketeollisuudessa ja pakkausmateriaalien valmistuksessa (Ashogbon ja Akintayo 2014). Lääketeollisuudessa tärkkelys on tärkeä tablettien apuaine (Burrell 2003). Biohajoavissa muoveissa, paperissa, liimassa kankaissa ja kipsilevyissä voidaan käyttää tärkkelystä. Maataloudessa tärkkelyksellä voidaan päällystää siemeniä, ja lannoitteissa sekä rehussa käytetään tärkkelystä.

Hardy ym. (2015) esittivät teorian siitä, että keitetty tärkkelys on ollut aivojemme kehittymisen edistäjänä satoja tuhansia vuosia sitten. Toisaalta nykyaikainen ruokavalio, jossa nopeasti sulavaa tärkkelystä saadaan ylimäärin, voi johtaa sairauksiin (Copeland ym. 2009). Hitaasti pilkkoutuvalla tärkkelyksellä, josta käytetään myös nimitystä resistentti tärkkelys, on havaittu yhteyksiä hyödyllisiin terveysvaikutuksiin. Tärkkelyksen pilkkoutumisnopeuteen elimistössä voidaan vaikuttaa elintarvikkeiden prosessoinnilla (Raigond ym. 2015). Amyloosin määrän suhde amylopektiinin määrään vaikuttaa tärkkelyksen pilkkoutumisnopeuteen elimistössä, amyloosi pilkkoutuu hitaammin ja amylopektiini nopeammin uskitetytymisen jälkeen. Resistentin tärkkelyksen määritelmäksi on esitetty, että se ei pilkkoudu glukoosiksi ohutsuolessa 120 minuutin kuluessa tärkkelyspitoisen ruuan nauttimisesta. Sen sijaan resistentti tärkkelys kulkeutuu paksusuoleen mikrobien fermentoitavaksi. Näin ollen resistentin tärkkelyksen katsotaan olevan ravintokuitua. Resistentin tärkkelyksen on todettu vaikuttavan glukoosivasteeseen; veren glukoositaso aterian jälkeen pysyy tasaisempana ja insuliinivaste paranee (Copeland ym. 2009).

2.2.4 Kauratärkkelyksen ominaisuudet

Kauran tärkkelyksellä on havaittu muista tärkkelyksistä poikkeavia ominaisuuksia (Autio 1990). Kauran lipidien on ehdotettu olevan erilaisen käyttäytymisen taustalla verrattuna muiden viljojen tärkkelyksen käyttäytymiseen. Amyloosin ja amylopektiinin on havaittu vuotavan jyväsistä yhtäaikaaisesti (Mua ja Jackson 1995). Muana ja Jacksonin (1995) mukaan amyloosin ja lipidien muodostamat kompleksit hidastivat amyloosin vuotamista ulos jyväsistä. Muiden viljojen tärkkelyksillä amyloosi vuotaa jyväsistä ensin (Gunaratne ja Corke 2004).

Eräässä tutkimuksessa selvitettiin kahden kauralajikkeen, NO 753-2 ja AC Stewart tärkkelyksien ominaisuuksia (Hoover ja Senanayake 1996). Tärkkelysjyvästen halkaisija oli noin 5 - 12 µm. Muodoltaan jyväset olivat epäsäännöllisiä monikulmioita, pinnaltaan tasaisia. Happohydrolyysillä erotettuja lipidejä oli 1,64 ja 1,67 %, liuottimilla erotettuja 1,62 ja 1,67 %. Amylaasia oli 22,5 ja 22,2 % tärkkelyksestä, ja amyloosiin kompleksoituneita lipidejä oli 14,0 ja 15,3 %. Lisää kauratärkkelyksen ominaisuuksista kerrotaan reologiasta kertovassa osassa.

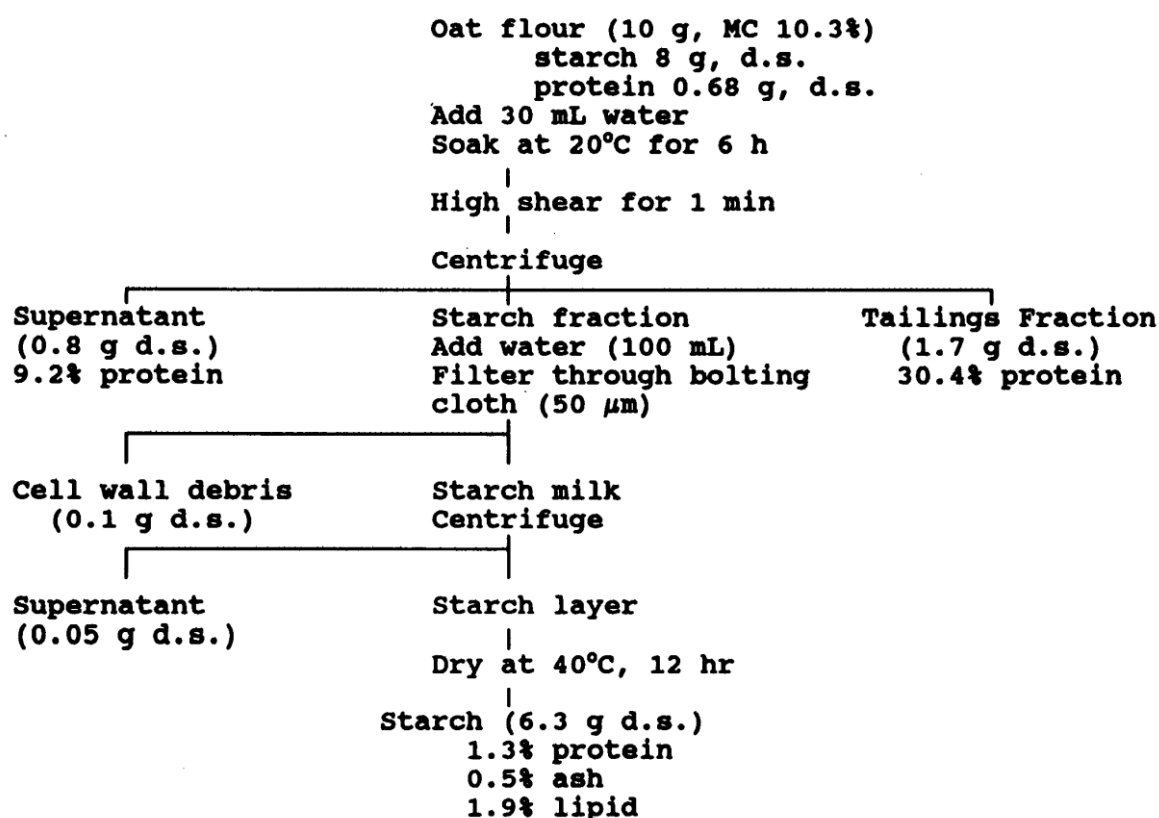
2.2.5 Kauratärkkelyksen eristäminen kaurajauhosta

Lim ym. (1992) vertailivat kolmea eri menetelmää tärkkelyksen eristämässä kaurajauhoista. Menetelmistä haluttiin erityisesti tietää niiden saanto ja tärkkelyksen puhtaus. Vertailtavat menetelmät olivat emäksisissä olosuhteissa ja pienellä leikkausvoimalla tehty puhdistus, proteaasia ja sellulaasia hyödyntävä puhdistus sekä suurta leikkausvoimaa hyödyntävä vesipuhdistus. Tutkimuksessa selvitettiin myös eri menetelmillä puhdistetun tärkkelyksen liisteröitymiskäyriä Rapid Visco Analyzerilla. Emäksellä puhdistetun tärkkelyksen tärkkelyksen liisteröitymiskäyrä muuttui, minkä pääteltiin olevan seurausta tärkkelyksen lysofosfolipidien kompleksoitumisesta emäksen natriumin ja kalsiumin kanssa.

Vedessä liottamalla puhdistetun kauratärkkelyksen saanto oli 70 % (kuva 3). Puhdistetun tärkkelyksen mukana oli jäljellä 1,3 % proteiinia; 0,5 % tuhkaa ja 1,9 % lipidejä. Emäksen kanssa suoritettussa puhdistuksessa saanto oli hieman suurempi, 72 - 76 % ja lopputuote selvästi puhtaampaa (0,3 % proteiinia; 0,3 % tuhkaa ja 1,0 % lipidejä). Entsyymien avulla puhdistetussa tärkkelyksessä sen sijaan epäpuhtauksia oli suunnilleen saman verran, kuin vedessä puhdistetussa tärkkelyksessä, ja saanto selvästi muita suurempi, 86 %.

Alkuperäisessä kaurajauhossa oli 80 % tärkkelystä; 6,8 % proteiinia; 0,6 % tuhkaa ja 3,1 % lipidejä.

Vedessä liottamisen optimaalinen kesto oli 6 tuntia. Vesi heikensi tärkkelyksen ja proteiinin välisiä sidoksia joko kastelemalla tai entsymaattisesti hydrolysoimalla. Suurella leikkausvoimalla käsittelemisen optimaalinen kesto oli 60 sekuntia. Suuren leikkausvoiman käyttö vaikutti huomattavasti sekä saantoon että tärkkelyksen puhtauteen.



Kuva 3. Tärkkelyksen puhdistaminen kaurajauhoista liottamalla vedessä ja käyttämällä suurta leikkausvoimaa. (Lim ym. 1992).

2.3 Beetaglukaanin ja tärkkelyksen reologia

2.3.1 Reologia yleisesti

Reologia on materiaalien virtaamisen ja muodonmuutoksen tutkimista (Fischer 2015). Materiaalien reologiaa voidaan mitata hyvin erilaisilla menetelmillä ja eri mittakaavoissa (Miri 2011). Reologisissa tutkimuksissa tutkittavaan materiaaliin kohdistetaan tarkasti määritettyjä ja tunnettuja leikkaavia voimia tai muodonmuutosta tietyn aikaa ja mitataan esimerkiksi materiaalin jäykkyyttä, kovuutta tai viskositeettia (Martinez 2018). Reometrian

avulla voidaan selvittää muun muassa elintarvikkeiden rakennetta ja komponenttien vuorovaikutuksia.

Aineen virtaaminen perustuu kahteen mekaniikan peruslakiin, jotka tunnetaan myös Newtonin lakeina (Fisher 2015). Newtonin laki:

$$\tau = \eta \dot{\gamma} \quad (1.0)$$

, jossa τ = leikkausjännitys, η = viskositeetti ja $\dot{\gamma}$ = leikkausnopeus. Viskositeetilla tarkoitetaan nesteen sisäistä kitkaa, virtaamisen vastustamista (Bourne 2002). Newtonisella nesteellä viskositeetti on vakio kaikilla leikkausnopeuksilla (Fischer 2015). Laimeiden suolojen tai sokerien vesiliuoksien, öljyjen tai laimeiden polymeeriliuoksien reologinen käyttäytyminen on Newtonista. Nesteet voivat sisältää kiinteitä hiukkasia, jolloin niiden käyttäytyminen on ei-Newtonista, ja niitä kutsutaan semi-fluideksi. Pieni määrä polymeeriä voi lisätä materiaalin viskositeettia merkittävästi. Sen sijaan monilla elintarvikkeilla virtausominaisuudet muuttuvat leikkausnopeuden tai -voiman muuttuessa epälineaarisesti. Silloin niitä kutsutaan leikkausoheneviksi, -paksuneviksi tai Binghamin fluideiksi. Niihin pätee yhtälö (yleistetty Newtonin laki):

$$\tau(\dot{\gamma}) = \eta(\dot{\gamma}) \dot{\gamma} \quad (2.0)$$

, jossa leikkausjännitys $\tau(\dot{\gamma})$ ja leikkausviskositeetti $\eta(\dot{\gamma})$ ovat riippuvaisia leikkausnopeudesta $\dot{\gamma}$. Kun materiaalilla on sekä viskoosisia että elastisia ominaisuuksia, sanotaan niitä viskoelastisiksi aineiksi (Miri 2011). Oskillaation avulla pystytään tutkimaan materiaalin viskoelastisia ominaisuuksia tai rakenteen muuttumista. Tuloksia kuvataan varastomodulilla G' ja häviömodulilla G'' . Varastomodulilla tarkoitetaan materiaalin elastisuutta, eli materiaaliin varastoitunutta energiaa. Elastisen aineen muodonmuutos on palautuvaa. Häviömodulilla puolestaan tarkoitetaan aineen viskoosisuutta, eli lämpönä menetettyä energiaa. Faasikulma, $\tan \delta = G''/G'$ saa arvoja $0 - 90^\circ$ välillä. 0° tarkoittaa täysin elastista materiaalia ja 90° viskoosia fluidia.

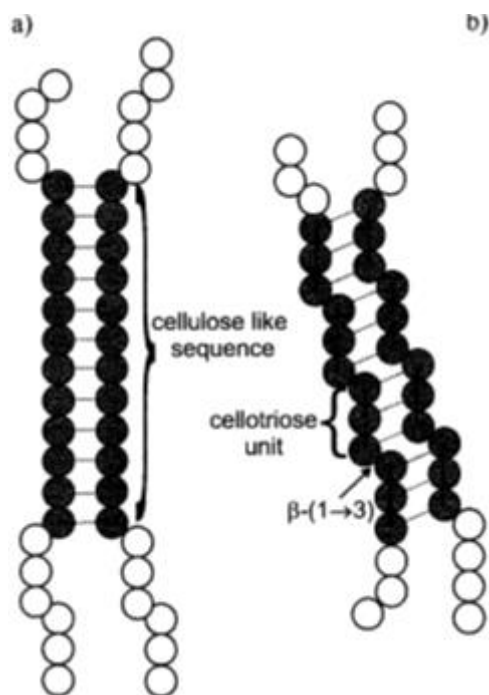
2.3.2 Beetaglukaanin reologia

Hyvin laimeat beetaglukaaniliuokset käyttäytyvät Newtonisen nesteen tavoin, kun taas 4 - 10 % liuokset osoittavat leikkausohenevaa käyttäytymistä (Autio 2006). Lämmitettäessä viskositeetti pienenee, mutta liuoksen jäähtyessä viskositeetti suurenee jälleen. Johanssonin (2006) tutkimuksissa beetaglukaanien vesiliuokset osoittivat polysakkarideille tyypillistä leikkausohenevaa käyttäytymistä. Pitoisuudella 0,15 % kauran beetaglukaanin vesiliuoksen

leikkausohenevuus oli voimakkaampaa, kuin ohran beetaglukaanin vesiliuoksen. Erot kauran ja ohran beetaglukaanin viskoelastisissa ominaisuuksissa johtuvat rakenne-eroista, joista myös suhdeluku DP3:DP4 kertoo.

Kriittisen pitoisuuden yläpuolella beetaglukaaniliuoksen viskositeetin on todettu nousevan jyrkästi (Doublier ja Wood 1995). Lazaridou ym. (2004) raportoi eri beetaglukaanien kriittisiksi pitoisuuksiksi pitoisuuksia 0,19 – 1,58 % välillä.

Myös molekyylipainolla on vaikutusta liuosten reologiseen käyttäytymiseen (Lazaridou ym. 2003, Autio 2006). Tutkimuksessa molekyylipainoltaan pienin beetaglukaani käyttäytyi aikariippuvaisesti, minkä tulkittiin olevan molekyylin sisäisten sidosten aiheuttamaa. Toisaalta molekyylipainolla voi olla vaikutusta beetaglukaanin aggregoitumistaipumukseen, mikä myös vaikuttaa liuosten reologisiin ominaisuuksiin. Lazaridou ym. (2004) raportoi molekyylipainon vaikutuksista kriittiseen pitoisuuteen, viskositeettiin, viskoelastisuuteen ja leikkausohenevuuteen. Vaikousi ym. (2004) havaitsivat epätavallista leikkausohenevuutta matalilla leikkausnopeuksilla, jonka he päättelivät johtuvan pienimolekyylisten beetaglukaanien aggregoitumisesta. Beetaglukaanin kyky muodostaa geeli on Toshin ym. (2004) mukaan riippuvaista molekyylipainosta. Böhmin ja Kulicken (1999a) hypoteesin mukaan geeliverkoston syntymiseen tarvitaan sellotriosyyliyksiköiden välisiä vetysidoksia (kuva 4). Molekyylipainon lasku ja pitoisuuden nousu nopeuttivat geeliytymistä ja toisaalta molekyylipainon kasvaessa geelin mekaaninen pysyvyys parani (Böhm ja Kulicke 1999b, Lazaridou ym. 2004). Doublier ja Wood (1995) vertailivat käsittelemättömän beetaglukaanin vesiliuoksen reologisia ominaisuuksia osittain hydrolysoidun beetaglukaanin vesiliuokseen. Käsittelemättömän pitoisuudeltaan 0,3 % näytteen käyttäytyminen oli newtonista. Sen sijaan osittain hydrolysoidun beetaglukaanin liuoksessa tapahtui aggregoitumista ja kolmiulotteisen verkoston muodostumista. Tutkijoiden päätelmä tuloksista oli, että hydrolysoidun beetaglukaanin pienempi molekyylipaino johti helpompaan diffuusioon ja siten useampiin aggregaatteihin. Korkea DP3:DP4 suhdeluku on liitetty geelin sameuteen, synereesiin, korkeampaan sulamispisteeseen ja nopeampaan geeliytymiseen. Johanssonin (2006) beetaglukaanin molekyylikokoon ja rakenteeseen liittyvissä tutkimuksissa saamat tulokset tukivat hypoteesia, että sellotriosyylien muodostamat liitosalueet (junction zones) mahdollistavat beetaglukaanin geeliytymisen ja että useammat liitosalueet lisäävät aggregoitumista. Moschakis ym. (2014) tuli tutkimuksissaan siihen tulokseen, että DP3:DP4 -suhde määrittää geeliytymisominaisuuksia ja geelin rakenteen. Matalan DP3:DP4 -suhdeluvun beetaglukaanin geeliverkosto vaikutti vähemmän järjestäytyneeltä rakenteelta.



Kuva 4. Beetaglukaanin geeliytymismekanismit on esitetty DP3-segmenttien välisten vetysidoksien muodostumisen. Kuva Böhm ja Kulicke 1999.

Mäkelä ym. (2017) tutkivat ohran ja kauran beetaglukaanin geeliytymistä eri lämpötiloissa. Tutkimuksissa huomattiin, että 1 % -liuoksessa kauran beetaglukaani muodostaa parhaiten geelin, kun se on liuotettu 37 °C -lämpötilassa. Ohralla 1,5 % -liuoksen geeliytymisen optimiliuotuslämpötila oli 57 °C. Lämpötilassa 87 °C liuotetulla beetaglukaanilla ei geeliytymistä tapahtunut kummallakaan. Aiemmin tehdyissä muiden ryhmien tutkimuksissa geeliytymistä oli havaittu huomattavasti suuremmissa pitoisuuksissa (3,5 - 10 %) (Böhm ja Kulicke 1999, Lazaridou ym. 2003, Tosh, Wood ja Wang 2003). Mäkelän ym. saamien tulosten perusteella pääteltiin, että matalissa beetaglukaanipitoisuuksissa geeliytyminen ei ole ainakaan kokonaan sellotriosyyliyksiköiden välisten sidosten ansiota, ja että geeliytyminen edellyttää beetaglukaanimolekyylien osittaista liukenemista.

2.3.3 Tärkkelyksen reologia

Liisteröimättömästä tärkkelyksestä valmistetuissa vesiliuoksissa viskositeetti on matala korkeillakin tärkkelyskonsentraatioilla (Ai ja Jane 2014). Kun tärkkelystä kuumennetaan vedessä, tärkkelysjyvät paisuvat veden imeytyessä niiden sisään, ja liuoksen viskositeetti nousee (Copeland ym. 2009). Amyloosin vuotaminen ulos jyvästä saa viskositeetin

nousemaan edelleen, mutta lopulta leikkausjännitys rikkoo turvonneet tärkkelysjuväset, ja viskositeetti laskee (Phimolsiripol 2011). Viskositeetti laskee lisää amyloosiketjujen asettuessa leikkaavan voiman suuntaisesti. Kiteisyys häviää eikä alkuperäistä rakennetta voida enää palauttaa (Copeland ym. 2009). Liisteröitymislämpötila on useimmilla tärkkelyksillä 60 - 80 °C. Lämpötilan laskiessa liuoksen viskositeetti kasvaa edelleen.

Gelatinoitumisen jälkeen lämpötilan laskiessa ja konsentraation ollessa riittävän korkea, vähintään 6 % (w/w), voi tärkkelysliuos muodostaa geelin (Ai ja Jane 2014). Tärkkelysgeelin rakenteen muodostuminen tapahtuu pääosin liuenneen amyloosin verkostoituessa, ja verkoston sitoessa vettä (Eliasson 1985, Ott ja Hester 1965, Ring 1985). Amylopektiinin uskityminen useiden päivien aikana tärkkelyksen liisteröitymisen jälkeen tekee tärkkelysgeelistä jäykemmän (Orford ym. 1987).

Kauratärkkelyksen liisteröitymislämpötilaksi on raportoitu 52 – 72 °C eri lähteissä (Wickström Jansson ja Lindahl 1991). Tutkimuksessa näytteenä käytettiin darrekäsitellystä kaurasta tehtyjä 15 – 20 % suspensioita. Liisteröitymistä tutkittaessa alkulämpötila oli 60 °C ja korkein lämpötila 90 °C. Korkeimmassa lämpötilassa näytettä pidettiin 10 minuutin ajan. Lämpötilan noustessa ja laskiessa muutosnopeus oli 6 °C/minuutti. Huippuviskositeetti saavutettiin noin 17 minuutin kohdalla. Reometrisissä mittauksissa suspensiot käyttäytyivät pseudoplastisesti, eli leikkausohenevasti (Wickström Jansson ja Lindahl 1991, Zhou 1998). Erona tutkimuksiin, joissa näytteenä on ollut puhdasta kauratärkkelystä, ei näissä kokeissa ilmennyt sedimentoitumista, minkä arveltiin johtuvan beetaglukaanin hydrokolloidisten ominaisuuksien vaikutuksesta. Tutkimuksessa seurattiin myös amylaasien vaikutusta näytteiden reologiseen käyttäytymiseen, ja todettiin, että teollisuudessa amylaasien käytöllä voidaan kasvattaa konsentraatioita pumppaamisen helpottuessa viskositeetin alenemisen vuoksi.

Eri kauralajikkeiden tärkkelyksillä on osoitettu olevan hyvin erilaisia piirteitä muun muassa turpoamisessa, liisteröitymislämpötilassa, liisteröitymisentalpiassa, hapon kestävyudessa, alttiudessa amylaasin aiheuttamalle hydrolyysille sekä uskitymisessä (Hoover ja Senanayake 1996). Erojen selittäjäksi on tarjottu amyloosin ja amylopektiinin ketjujen pituuksien eroja, sekä amorfisen ja kiteisen alueiden sisällä ja niiden välillä olevia ketjujen keskinäisiä vuorovaikutuksia.

Aution (1990) tutkimuksissa kauratärkkelyksen mikrorakenteessa tapahtui suuria muutoksia, kun lämpötilaa nostettiin 90 °C:sta 95 °C:seen. 90 °C:ssa amyloosi muodosti juvästen ympärille verkkomaista rakennetta, josta osa hajosi, ja 95 °C:ssa amylopektiini

muodosti tiiviin verkoston. Myöhemmissä tutkimuksissa selvitettiin tarkemmin mikrorakenteen muutoksia (Virtanen ym. 1992). Tärkkelysjyvät rikkoutuivat lämpötilan noustessa 90 – 95 °C:seen. Amylopektiini muodosti jatkuvan faasin, johon amyloosi oli jakautunut lämpötilan saavuttaessa 95 °C. Varastomoduli G' nousi dispersion jäähtyessä alle 40 °C:seen, kun dispersio oli ensin lämmitetty 95 °C:seen. Dispersion jäähtymisessä esiintyi siirtymätiloja kahdessa vaiheessa (Virtanen ym. 1992). Ensimmäisessä tapahtui amylopektiinin ja amyloosin muodostamien faasien separoituminen ja toisessa amyloosi aggregoitui.

2.4 Beetaglukaanin ja tärkkelyksen vuorovaikutusten tutkiminen

2.4.1 Aiemmat beetaglukaanin ja tärkkelyksen vuorovaikutuksia käsittelevät tutkimukset

Jaskarin ym. (1995) tekemissä tutkimuksissa kauraleseistä oli valmistettu lietteitä, jotka altistettiin lämpö- ja entsyymikäsittelyille. Fytaaasilla käsitellyn näytteen viskositeetti pieneni, minkä ajateltiin olevan seurausta liisteröityneen tärkkelyksen ja beetaglukaanin pilkkoutumisesta. Tutkimuksessa havaittiin myös viskositeetin pienenevän vain vähän, kun tärkkelys oli pilkkoutunut, mutta suuri muutos viskositeetissa havaittiin beetaglukaanin osittaisen hydrolysoinnin jälkeen.

Kim ja White (2012) tutkivat, miten beetaglukaani, tärkkelys ja proteiini vaikuttavat viskositeettiin ja sappihappojen sitomiseen *in vitro* kaurasta valmistetuissa lieteissä. Kaurajauhosta valmistetut lietteet kuumentettiin, jäähdytettiin ja käsiteltiin entsyymeillä kahdeksalla tavalla. Likkenaasilla sekä likkenaasilla, amylaasilla ja/tai proteinaasilla käsiteltyjen näytteiden sappihappojen sitominen *in vitro* pieneni, kun taas pelkästään proteinaasilla ja/tai amylaasilla käsiteltyjen näytteiden sappihappojen sitominen lisääntyi. Tutkimuksen loppupäätelmä oli, että beetaglukaanilla ja sen vuorovaikutuksilla proteiinien ja tärkkelyksen kanssa on merkitystä sappihappojen sitomisessa, ja toisaalta ruuan komponentteja on tarkasteltava kokonaisuutena, kun tutkitaan terveysvaikutuksia.

Brennan (2004) selvitti laajassa projektissaan ohran beetaglukaanin lisäämistä erilaisiin elintarvikkeisiin. RVA:lla tehdyissä kokeissa 5 % ohran beetaglukaania sisältävässä näytteessä huomattiin merkittäviä eroja suhteessa kontrollinäytteeseen. Huippuviskositeetti, loppuviskositeetti ja rikkoutumisviskositeetti pienenevät. Syynä ajateltiin olevan β -glukaanin kyvyssä sitoa vettä, jolloin tärkkelyksen liisteröityminen vähenee. Myös leivän ja pastan

valmistuksessa todettiin sama ilmiö; *in vitro* -digestiokokeissa ohran beetaglukaani vähensi sokerien vapautumista, koska tärkkelyksen hajoaminen saattoi olla vähäisempää.

Battilana ym. (2001) halusivat selvittää, onko β -glukaanien nauttimista seuraavalle aterianjälkeisellä glukoositason alenemiselle muita selityksiä, kuin hiilihydraattien imeytymisen hidastuminen. Tutkimuksen tulosten perusteella arveltiin, että glukoositason alenemisen taustalla oli enimmäkseen hiilihydraattien hitaampi ja vähäisempi imeytyminen eikä fermentoivien mikrobien toiminta paksusuolessa.

Izydorczyk ym. (2005) tutkivat nuudeleita, joiden valmistamiseen oli käytetty vehnän lisäksi kuitupitoisia ohrajauhoja. Ohrajauhoilla täydennettyjen nuudeleiden liisteröitymislämpötila ja veden absorptio osoittautui korkeammaksi kontrollinäytteeseen verrattuna. Digestio *in vitro* -kokeessa osoitti ohrapitoisten nuudeleiden vähentävän glukoosin vapautumista tärkkelyksestä huomattavasti. Erojen arveltiin johtuvan tärkkelysjyvästen kapseloitumisesta ja siten tärkkelystä hajottavien entsyymien pääsyn estymisestä substraattinsa luo, liukoisen kuidun osittaisesta liukenemisesta sopivissa lämpötila- ja kosteusolosuhteissa sekä veden jakautumisesta matriisissa.

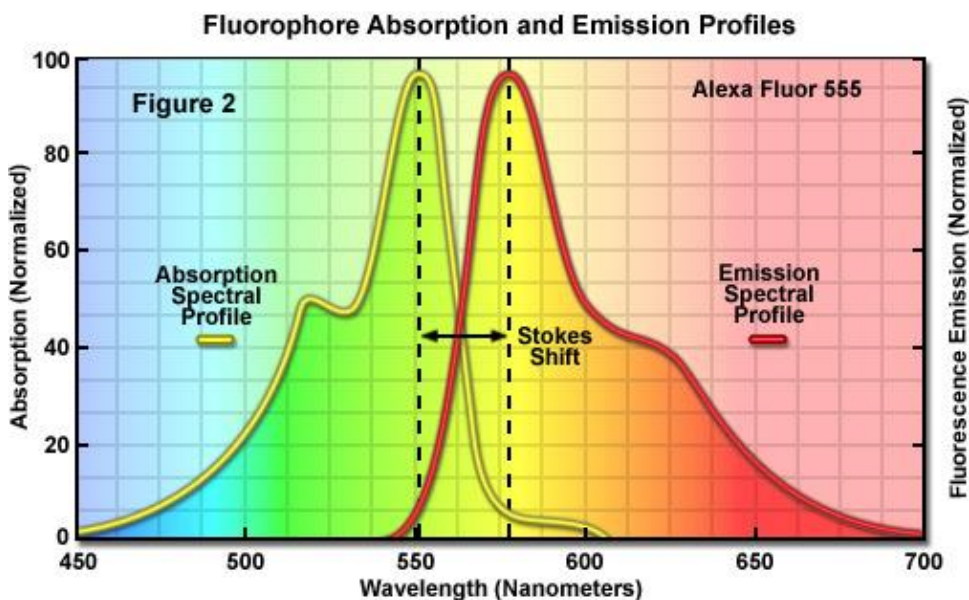
Li ym. (2016) tutkivat ohran beetaglukaanin ja vehnätärkkelyksen vuorovaikutuksia käyttäen muun muassa RVA:ia, reometrillä tehtyä oskillointimittausta ja mikroskopiaa. RVA:lla valmistettiin eri suhteissa liuoksia, joissa kuiva-ainekonsentraatio oli yhteensä 6 % (w/v). Beetaglukaani liuotettiin ensin erikseen veteen. Liuoksista tehtiin reometriset mittaukset heti valmistukseen jälkeen. Näytteistä määritettiin myös partikkelikokojakauma, paisuminen (swelling power), liukoisuusindeksi, ja amylaasin vuotaminen jyväsistä (leaching). Viskositeetti nousi beetaglukaania sisältävissä liuoksissa merkittävästi, minkä aiheuttajaksi arveltiin tärkkelysjyvästen voimakkaampaa paisumista, jyvästen muodon muuttumista ja tärkkelyksen vuorovaikutusta beetaglukaanin kanssa jatkuvassa faasissa. Viskositeetin nousemisen todettiin olevan suorassa yhteydessä beetaglukaanin konsentraatioon. Elektronipyyhkäisymikroskoopilla näytteiden rakennetta tarkasteltaessa havaittiin, että beetaglukaania sisältävissä näytteissä verkosto oli ehjempi ja säännöllisempi kuin pelkkää tärkkelystä sisältävässä näytteessä.

2.4.2 Vuorovaikutuksien tutkimiseen soveltuvia menetelmiä

2.4.2.1 Fluoresenssimikroskopia

Fluoresenssimikroskopia perustuu fluoresoivien pintojen emittoiman valon näkemiseen suodattamalla kaikki ylimääräiset valonsäteet ja mittaamalla jäljelle jäävää fluoresenssia (Lichtman ja Conchello 2005). Näin saadaan tutkittavat pinnat näkymään värillisinä mustalla taustalla. Orgaanisilla materiaaleilla on luontaista fluoresenssia, autofluoresenssia, mutta yleensä tutkimuksissa värjätään tutkittavat kohteet synteettisillä väriaineilla eli fluorofooreilla, joiden virittymiseen tarvitaan vähän energiaa. Fluoresenssimikroskoopilla voidaan nähdä jopa yksittäiset molekyylit.

Fluoresenssi perustuu ilmiöön, jossa emittoidun fotonin aallonpituus on absorboidun fotonin aallonpituutta pidempi. Ilmiötä kutsutaan Stokesin siirtymäksi (kuva 5). Fluoresenssi on valon emissiota, joka tapahtuu nanosekunneissa valon absorboitumisesta pintaan. Fluoroforin absorboiman fotonin energia siirtyy fluoroforille. Energian määrä on kääntäen verrannollinen fotonin aallonpituuteen. Tutkimukseen valittu fluorofori vaikuttaa, millä aallonpituudella kohdetta voidaan tutkia.



Kuva 5. Fluoresenssimikroskoopin muodostama kuva perustuu aallonpituuksien eroon, Stokesin siirtymään (Stokes shift) absorboidun valon ja emittoidun valon välillä. Lainattu Zeiss Microscopy.

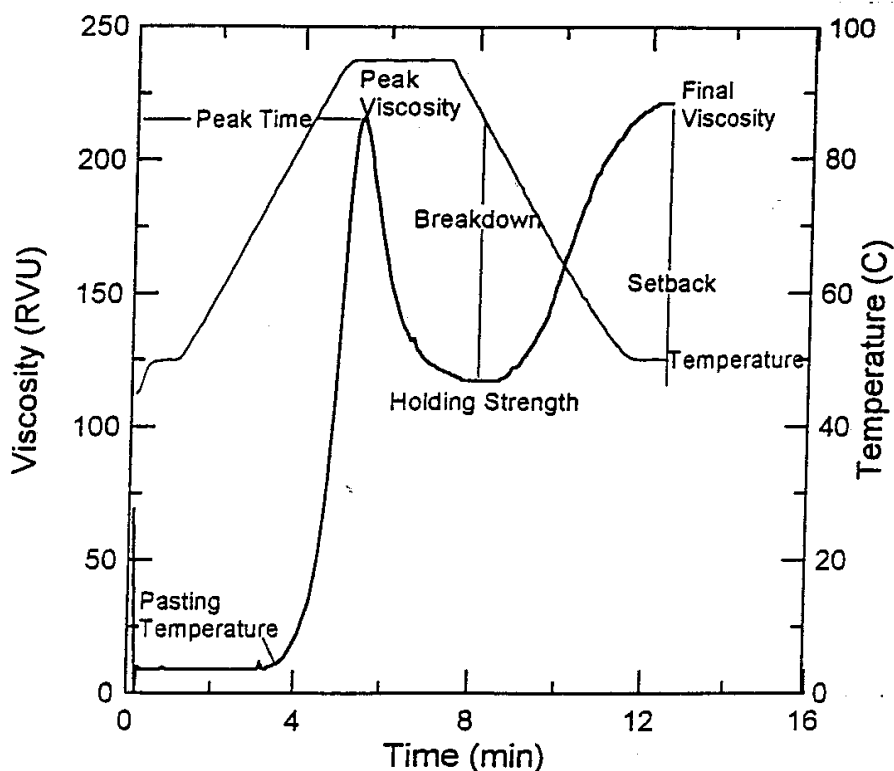
Fluoresenssimikroskopian etuna on erittäin tarkka solujen tunnistaminen ja korkealaatuiset kuvat (Jensen 2012). Haittana on fluoroforien menettäminen kykynsä fluoresoida, vain

fluoresoivien rakenteiden näkeminen, autofluoresenssi, jota ei onnistuta kokonaan suodattamaan pois ja elävien solujen tutkimisessa fototoksisuus.

Beetaglukaanin tutkimisessa on käytetty fluorokromeina calcofluor valkoista ja aniliini sineä (MacGregor ym. 1989, Fulcher ym. 1977). Fulcher ym. käyttivät tutkimuksissaan Zeiss – mikroskooppia filterillä UG5/41 (calcofluor valkoinen) ja BG12/53 (aniliini sini). MacGregor ym. tekivät tutkimuksensa Wild Leitz Orthoplan –mikroskoopilla, filtereillä BP 340-380 nm LP 430 nm. Fulcherin ym. tutkimuksissa calcofluor valkoinen antoi beetaglukaanille kirkkaan vihreän värin ja aniliini sinelle kirkkaan keltaisen värin.

2.4.2.2 RVA

Rapid Visco Analyzer (RVA) on yksi yleisimmistä tärkkelyksen liisteröitymisen tutkimiseen käytetyistä laitteista (Zhou ym. 1988). Sen etuja ovat muun muassa pieni näytemäärä, mahdollisuus säätää lämpötilaa, nopea kuumennus, tehokas sekoitus (Zhou ym. 1988, Hazelton ja Walker 1996). RVA:lla voidaan määrittää näytteen liisteröitymislämpötila, huippuviskositeetti, aika huippuviskositeetin saavuttamiseen, rikkoutumisviskositeetti (engl. breakdown), välivahvuus (engl. holding strength), loppuviskositeetti sekä palautumis -viskositeetti (engl. setback) (kuva 6) (Zhou ym. 1988). Hazelton ja Walker (1996) selvittivät tutkimuksissaan viivettä näytteen lämpötilan ja laitteen lämpötilan välillä, mikä aiheuttaa epätarkkuutta esimerkiksi huippuviskositeetin ajankohdan määrittämisessä.



Kuva 6. Tyypillinen RVA-käyrä, josta voidaan määrittää mitattavan näytteen liistautumislämpötilä, huippuviskositeetti, aika huippuviskositeetin saavuttamiseen, rikkoutuminen, välivahvuus, loppuviskositeetti ja palautuminen (Zhou ym. 1998).

2.4.2.3 Oskilloiva reologinen mittaus

Oskilloivassa mittauksessa näyte altistetaan joko vaihtuvalle leikkausjännitteelle tai muodonmuutokselle eri taajuuksilla, ja mitataan näytteen vastetta (Miri 2011). Mittaustuloksina saadaan jo aiemmin tässä kirjallisuuskatsauksessa mainitut varastomoduuli G' , häviömoduuli G'' ja niiden suhde $\tan \delta$.

Mittauksissa voidaan käyttää vakioitua leikkausmyöntymää (controlled strain), jolloin mitataan leikkausjännitystä, tai käytetään vakioitua leikkausjännitystä (controlled stress) jolloin mitataan näytteen suhteellista muodonmuutosta (Fischer 1998). Kunkin mittauksen tulee kestää riittävän kauan, jotta materiaali saavuttaa tasapainotilan.

Geeleille ja nesteille sopivia mittapäitä ovat kartio-levy ja levy-levy -mittapäät (Miri 2011). Niitä käytettäessä mittauksiin tarvittava näytemäärä on pieni ja ne ovat helposti puhdistettavia. Kartio-levy -mittapäällä partikkelikoon on oltava 5-20 μm , mikä rajoittaa tutkittavia materiaaleja, ja käytettäessä korkeita leikkausnopeuksia mitattava materiaali saattaa siirtyä pois paikaltaan, mikä puolestaan aiheuttaa virheitä tuloksiin. Levy-levy

mittapään erityisenä etuna on se, että mittauksessa käytettävää levyjen väliä voidaan säätää helposti.

2.4.2.4 Vuorovaikutuksien tutkiminen faasiseparaation avulla

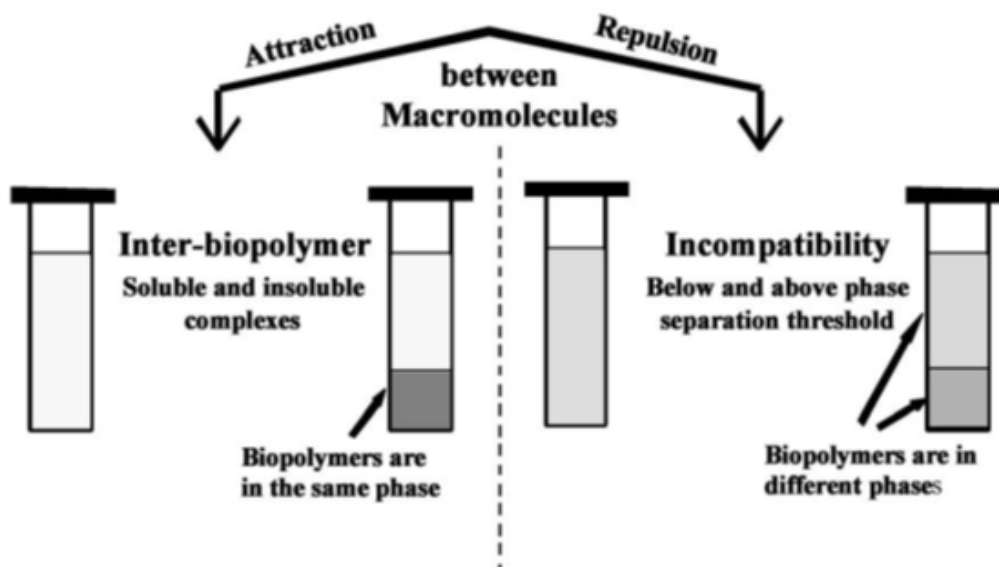
Tolstoguzovin (2003) mukaan elintarvikkeiden makromolekyylien väliset vetovoimat ja hylkiminen selittävät molekyylien yhteensopimattomuutta ja kompleksien muodostumista (kuva 7). Biopolymeerien yhteensopimattomuus johtaa faasien eriytymiseen, ja kussakin faasissa on yhtä polymeeriä enemmän kuin muita. Kunkin biopolymeerin konsentraatiot suurenevat faasiseparoitumisen vuoksi. Jos vetovoimaa ei ole kahden erilaisen biopolymeerin välillä, ne pysyvät samassa faasissa vain laimeissa liuoksissa.

Garnier ym (1995) tutkivat dekstraanin ja valeakaasian (engl. locust bean gum) faasiseparoitumista. Tutkimusta varten valmistettiin liuoksia eri konsentraatioilla. Faasiseparoiminen toteutettiin säilyttämällä liuoksia 20 °C:ssa 48 tuntia. Faasiseparaation jälkeen faaseista mitattiin molekyylikoko HPSEC:n avulla, rakententeita tarkasteltiin fluoresenssimikroskoopilla ja tutkittiin faasien reometrisia ominaisuuksia oskilloimalla. Osa liuoksista oli faasiseparoituneita jo 24 tunnin jälkeen. Toisessa faasissa oli pelkästään dekstraania nestemäisenä ja toisessa molempia biopolymeerejä geelimäisenä. Geelimäisen olomuodon selitti valeakaasiasta peräisin olevan galaktomannaanin korkea pitoisuus faasissa.

MacDougallin ym. (1997) mukaan ennen faasiseparaation suorittamista on tärkeää tuntee tutkittavista materiaaleista, mikä on pienin pitoisuus, jossa polymeerien kietoutumista tapahtuu. Heidän tutkimuksissaan soluseinästä peräisin olevia polysakkarideja fraktioitiin CDTA:n, Na₂CO₃:n ja KOH:n avulla ja annettiin seistä huoneenlämmössä 48 tuntia, jonka jälkeen ne sentrifugoitiin käyttäen 13 000g 30 minuutin ajan. Alempi faasi kerättiin neulalla putken läpi, ylempi faasi pipetoitiin. Lopuksi määritettiin faasien sokerikoostumus ioninvaihtokromatografisesti.

Lazaridou ja Biliaderis (2008) selvittivät beetaglukaanin ja pullullaanin sekä natriumkaseinaatin faasiseparoitumista. Liuosten valmistuksen jälkeen niitä säilytettiin 20 °C:ssa 18:n tunnin ajan, ja sentrifugoitiin käyttäen 900g kahden tunnin ajan. Näytteistä arvioitiin faasiseparoituminen visuaalisesti, arvioitiin faasien tilavuudet, erotettiin faasit, määritettiin faasien koostumus, ja tehtiin reometrinen mittausta oskilloimalla 0,1 % leikkausjännityksellä ja leikkausnopeuksilla 0,1-10 Hz. Faasiseparoituminen vaikutti

kiihdyttävän beetaglukaaniketjujen välisten sidosten muodostumista konsentraation suurenemisen vuoksi, ja ketjujen väliset sidokset toisaalta lisäsivät viskositeettia ja siten estivät molekyylien liikkumista.



Kuva 7. Faasiseparoitumiseen vaikuttaa molekyylien varaukset, konsentraatiot ja ioninen vahvuus. Vetovoima molekyylien välillä johtaa siihen, että molekyylit pysyvät samassa faasissa, kun taas neutraali vuorovaikutus tai poistovoimat molekyylien välillä saa molekyylit siirtymään eri faaseihin. Saman merkistä varausta kantavat biopolymeerit ovat yhteensopimattomia. Faasiseparoituminen johtaa polymeerien konsentraatioiden suurenemiseen (Tolstoguzov 2003).

3 KOKEELLINEN TUTKIMUS

Työn tavoitteena oli löytää reologisilla menetelmillä näytteistä eroja, jotka voisivat olla seurausta beetaglukaanin ja tärkkelyksen vuorovaikutuksista. Lisäksi tavoitteena oli saada lisää tietoa vuorovaikutusten luonteesta.

3.1 Materiaalit ja menetelmät

3.1.1 Materiaalit

Työn beetaglukaani uutettiin kauralesekonsentraatista (OBC N20, parasta ennen 2.6.2018, Raisio). Tärkkelyksinä oli kauraydinjauho (parasta ennen 16.4.2018, Raisio), josta eristettiin kauratärkkelys, ja vehnätärkkelys (Foodstar, Kröner Stärke, erä 1101010300, parasta ennen 04/2013).

Beetaglukaanin uutossa käytetty proteaasi valmistettiin liuottamalla 0,504 g NaHCO_3 (Merck, erä 2566390, Saksa) 40 ml:aan milliQ-vettä, lisäämällä 0,750 g pankreatiinia (Sigma-Aldrich, erä SLBD0640V, USA), inkuboimalla 37 °C lämpötilassa 20 minuuttia sekoittajassa ja sentrifugoimalla nopeudella 4000 rpm 10 minuutin ajan (Eppendorf 5810R). Beetaglukaanin sakkauttamisessa käytettiin etanolia (ETAX A 94 paino-%, Altia Oyj) ja puhdistuksessa puhtaampaa etanolia (ETAX Aa, 99,5 paino-%, Altia Oyj).

3.1.2 Menetelmät

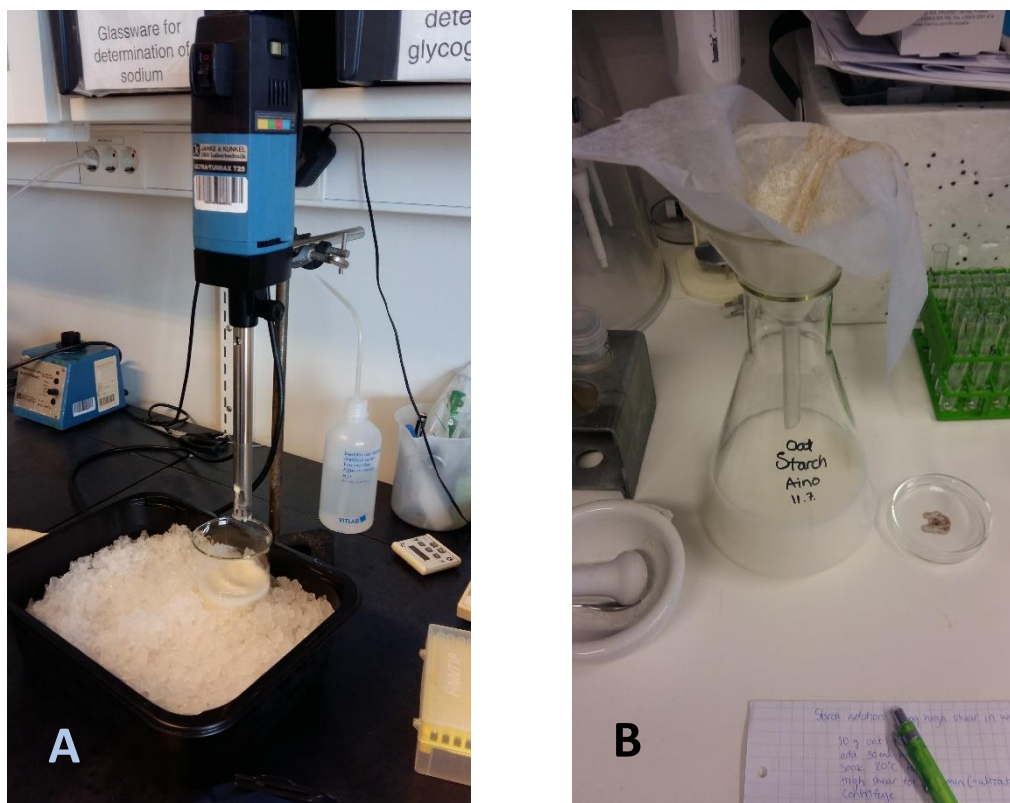
3.1.2.1 Beetaglukaanin uuttaminen kauralesekonsentraatista

Työskentely aloitettiin uuttamalla beetaglukaani kauralesekonsentraatista. Kuuteen sentrifuugipulloon punnittiin 20 g kauralesekonsentraattia ja pulloihin lisättiin 350 ml milliQ-vettä. Seoksia inkuboitii 40 °C lämpötilassa 30 minuutin ajan sekoittajassa (Heidolph Unimax 1010 ja Heidolph Inkubator 1000, Saksa), jonka jälkeen ne sentrifugoitiin (Beckman Avanti J-25 I, USA) 10000 rpm (16000 G) nopeudella 10 minuuttia. Supernatantti kerättiin, keitettiin vesihauteessa 10 minuuttia proteiinien denaturoimiseksi ja sentrifugoitiin (10000 rpm 10 minuuttia). Beetaglukaanisupernatanttiin lisättiin 4,5 ml proteaasiluosta, jonka avulla pilkottiin proteiinit 37 °C lämpötilassa 10 minuuttia. Tämän jälkeen proteiinit sakkautettiin keittämällä 10 minuuttia, ja jälleen liuos sentrifugoitiin (10 000 rpm, 10 minuuttia). Supernatantit (yhteensä noin 1800 ml) kaadettiin kahteen 5000 ml dekanterilasiin. Dekanterilaseihin lisättiin magneettisekoittajat, ja byrettien kautta lisättiin

beetaglukaanin sakkauttamiseksi etanolia kaksinkertainen tilavuus beetaglukaaniliuoksen määrään nähden. Etanolisakkauksen jälkeen seoksia säilytettiin +5 °C lämpötilassa yön yli, jolloin beetaglukaani saostui pohjalle. Seuraavana aamuna etanolikerros kaadettiin pois, ja dekantterilasın pohjalla oleva etanolin ja sakkautuneen beetaglukaanin seos siirrettiin Falcon -putkiin. Putket sentrifugoitiin 4000 rpm nopeudella 5 minuutin ajan, ja kaadettiin etanoli pois. Sakka kerättiin uusiin Falcon –putkiin, lisättiin etanolia säilyttäen suhde 1:2 (sakka:etanoli). Etanolilla huuhtelu ja sentrifugointi toistettiin 2 – 3 kertaa, kunnes beetaglukaani oli puhtaan valkoista ja etanoli kirkasta. Beetaglukaanipelletti siirrettiin huumareeseen, sekoitettiin etanoliiin ja laitettiin yöksi +60 °C:een kuivumaan. Kuivunut beetaglukaani rikottiin jauheeksi survimella ja siivilöitiin keittiösiivilällä.

3.1.2.2 Tärkkelyksen eristäminen kauraydinjauhosta

Kauraydinjauhosta haluttiin eristää tärkkelys, jotta saataisiin mahdollisimman tarkkoja tietoja juuri tärkkelyksen vuorovaikutuksista beetaglukaanin kanssa. Työssä käytettiin Limin ym. (1992) menetelmää, jossa ei tarvita emästä, koska sen käyttö voi vaikuttaa tärkkelyksen reologisiin ominaisuuksiin. Kauraydinjauhoja punnittiin 40 g, lisättiin 120 ml milli-Q-vettä ja liotettiin sekoittajassa kuusi tuntia. Liotuksen jälkeen seosta käsiteltiin homogenisaattorilla (Ultra Turrax T25, Janke & Kunkel, Saksa) minuutin ajan jäähauteessa (kuva 8). Seos sentrifugoitiin (4000 g, 15 min) ja kaadettiin supernatantti pois. Sakasta kerättiin päällimmäinen vaalean ruskea kerros pois ja pohjalta kerättiin tärkkelyskerros talteen. Tärkkelys sekoitettiin 400 ml:an milli-Q-vettä ja suodatettiin kankaan (Miracloth, huokoskoko 22 – 25 µm) läpi.



Kuva 8. Vasemmalla Ultra Turrax (A), jolla liotettu kauraydinjauholiuos käsiteltiin kauratärkkelyksen eristämistä varten. Oikealla käsitellyn liuoksen suodattaminen Miracloth -kankaan läpi (B).

Liuos sentrifugoitiin (4000 g, 15 min) ja supernatantti kaadettiin pois. Sakan päällimmäinen vaalean ruskea kerros poistettiin, ja lopulta kerättiin huumareeseen valkea sakka. Tärkkelys kuivattiin yön yli 40 °C:ssa ja siivilöitiin keittiösiivilällä (kuva 9).



Kuva 9. Kauratärkkelys siivilöitiin keittiösiivilällä kuivaamisen jälkeen, jotta partikkelikoko olisi pienempi ja liuottaminen helpompaa.

3.1.2.3 Geelien valmistus

Rapid Visco Analyzer -laitteella (RVA, Newport Scientific, Australia) valmistettiin vehnätärkkelyksestä ja kauraydinjauhosta geelejä (taulukko 1). Näytteitä varten punnittiin 24,5 g milliQ-vettä ja 1,5 g tärkkelystä jokaisen erän valmistukseen. Mittausohjelma oli AACC:n (1997) yleinen tärkkelyksen liisteröimismenetelmän 76-21.02 mukainen. Ohjelma kesti yhteensä 13 minuuttia ja korkeimmillaan lämpötila kävi 95:ssä °C:ssa noin kolmen minuutin ajan (standardiohjelma 1, taulukko 2). RVA:n avulla kerättiin tietoa seoksen viskositeetista ajan funktiona lämmityksen ja jäähtymisen aikana.

Yhdessä liuotetut

Ensin haluttiin tutkia, miten beetaglukaanin lisääminen tärkkelysliuokseen vaikuttaa liuoksen viskositeettiin ja geelin rakenteeseen. RVA:lla valmistettiin 95 °C:n lämpötilassa beetaglukaanin ja tärkkelyksen seokset lisäämällä beetaglukaania kauraydinjauhojen, kauratärkkelyksen ja vehnätärkkelyksen joukkoon. 95 °C valittiin liuotuslämpötilaksi, jotta tärkkelys saatiin liisteröityä mahdollisimman täydellisesti. Beetaglukaania käytettiin 0,13 g, tärkkelystä 1,37 g ja milliQ-vettä 24,50 g. Punnitsemisen jälkeen tärkkelys ja beetaglukaani sekoitettiin keskenään, kuiva-aineseos lisättiin veteen, ja seosta kuumennettiin RVA:lla. Lisäksi haluttiin tutkia, mitä tapahtuu, kun beetaglukaanin joukkoon lisätään ensin 1 ml etanolia, ja sitten lisätään 23,5 ml milliQ-vettä ja lopuksi tärkkelysjauho ennen RVA:ssa tapahtuvaa kuumennusta, koska etanoli voi edistää beetaglukaanin liukenemista. Kontrolliksi valmistettiin RVA:lla 0,5 % beetaglukaaniliuos punnitsemalla 0,13 g beetaglukaania, kostuttamalla beetaglukaani 1 ml:lla 99,5 % etanolia ja lisäämällä 23,5 g milliQ-vettä.

Taulukko 1. Näytteiden valmistusmenetelmät.

Kontrolli	Sekoitus kuivana, liuotus yhdessä	Liuotus erikseen, liuosten yhdistäminen
Beetaglukaani 37 °C 2h	Beetaglukaani ja vehnätärkkelys 95 °C	Beetaglukaani 85 °C ja vehnätärkkelys 95 °C
Beetaglukaani 85 °C 2h	Beetaglukaani ja kauratärkkelys 95 °C	Beetaglukaani 85 °C ja kauratärkkelys 95 °C
Vehnätärkkelys 95 °C	Beetaglukaani, etanoli ja vehnätärkkelys 95 °C	Beetaglukaani 37 °C ja vehnätärkkelys 95 °C
Kauratärkkelys 95 °C	Beetaglukaani, etanoli ja kauratärkkelys 95 °C	Beetaglukaani 37 °C 15 min ja vehnätärkkelys 95 °C
Vehnätärkkelys 0,8 g 95 °C	Beetaglukaani ja vehnätärkkelys 0,8 g 95 °C	
Beetaglukaani 37 °C asti 15 min	Beetaglukaani ja vehnätärkkelys kuumennuslevyllä 95 °C 2h ajan	

Taulukko 2. RVA:n standardiohjelma (AACC 1997).

Aika (hh:mm:ss)	Lämpötila (°C)	Sekoitusnopeus (rpm)
0	50	960
0:00:10	50	160
0:01:00	50	160
0:04:42	95	160
0:07:12	95	160
0:11:00	50	160
0:13:00	Loppu	

Lämpölevyllä liuotetut

Laimeiden beetaglukaaniliuosten geeliytymistä tutkittaessa on havaittu, että 1 % kauran beetaglukaani geeliytyy parhaiten 37 °C:ssa, ja 87 °C:ssa geeliytymistä ei tapahtunut ollenkaan (Mäkelä ym. 2017). Beetaglukaanista valmistettiin pitoisuudeltaan 0,5 % liuoksia keittolevyillä erlenmeyerpullossa sekä kauran beetaglukaenin geeliytymiselle

optimaalisessa 37 °C:n lämpötilassa että 85 °C:n lämpötilassa. Kuivaa beetaglukaania punnittiin 0,05 g, lisättiin etanolia (ETAX Aa) 0,5 ml ja lopuksi lisättiin vettä 9,5 ml. Liuotuksen ja jäähtymisen aikana käytettiin magneettisekoittajaa. Ennen jäähtymistä tarkistettiin punnitsemalla, että liuoksen massa on 10 g ja tarvittaessa lisättiin milli-Q-vettä haihtuneen veden ja etanolin tilalle. Liuotukseen käytettiin noin 2 h ja jäähtymykseen noin 1 h. Samalla tavalla valmistettiin beetaglukaanin ja tärkkelyksen yhdistelmät, joissa beetaglukaanin liuotuslämpötila oli 37 °C ja vehnätärkkelyksen, kauratärkkelyksen sekä kauraydinjauhon liuotuslämpötila 95 °C, ja beetaglukaanin liuotuslämpötila 85 °C ja vehnätärkkelyksen, kauratärkkelyksen sekä kauraydinjauhon liuotuslämpötila 95 °C. Beetaglukaania punnittiin 0,1 g, lisättiin 1 ml etanolia ja 9 ml milliQ-vettä. Tärkkelysliuosten valmistuksessa käytettiin 2,74 g vehnätärkkelystä, kauratärkkelystä tai kauraydinjauhoa, ja 23,26 g milliQ-vettä, jotta lopullisen seoksen pitoisuudet saatiin vastaamaan RVA:lla valmistettujen näytteiden pitoisuuksia. Samoin kuin beetaglukaaniliuoksen valmistuksessa, sekoittamiseen käytettiin magneettia. Astiana oli 200 ml dekantterilasi, joka oli päältä suojattu foliolla haihtumisen ehkäisemiseksi. Kuumentaminen kesti 15 minuuttia. Kuumennuksen jälkeen liuos punnittiin ja lisättiin haihtuneen veden tilalle vettä. Beetaglukaaniliuokseen lisättiin 10 g tärkkelysliuosta ja sekoitettiin voimakkaasti magneettisekoituksessa noin viiden minuutin ajan.

RVA:lla valmistetun kuivaseoksen ja levyllä erikseen liuotettujen beetaglukaanin ja tärkkelyksen seoksen välimuodoksi valmistettiin myös levyllä noin kahden tunnin ajan kuumennettu kuivaseos kuumennuslevyllä, jotta voitaisiin vertailla miten beetaglukaanin perusteellisempi liuottaminen yhdessä tärkkelyksen kanssa vaikuttaa geelin rakenteeseen verrattuna nopeasti kuumennetusta beetaglukaanin ja tärkkelyksen seoksesta valmistettuun geeliin. Kuivaseoksella tarkoitetaan tässä beetaglukaanin ja tärkkelyksen sekoittamista keskenään ennen nesteen lisäämistä.

Muut

Vehnätärkkelyksellä tutkittiin geelinmuodostumista laimeilla liuoksilla punnitsemalla 1 g vehnätärkkelystä, jotta löydettäisiin pitoisuus, jossa tärkkelys ei muodosta geeliä. Seuraavaksi sama tehtiin punnitsemalla 0,8 g vehnätärkkelystä. Liuokset valmistettiin RVA:lla standardiohjelma 1:n mukaisesti, kuten muutkin liuokset. 0,8 g vehnätärkkelystä sisältäneestä liuoksesta valmistettua geeliä verrattiin sekä saman verran tärkkelystä ja 0,5 % beetaglukaania sisältävään geeliin sekä kuiva-ainepitoisuudeltaan samanlaiseen eli 0,67

g:sta vehnätärkkelystä ja 0,5 % beetaglukaania valmistettuun geeliin. Kokeen tavoitteena oli selvittää, pystytäänkö beetaglukaania ja tärkkelyksen vuorovaikutuksien avulla saamaan aikaan geelirakenne niin pienillä pitoisuuksilla, joilla kumpikaan ei itsestään muodosta geelirakennetta.

Lyhyen liuostusajan vaikutusta beetaglukaania geeliytymiseen tutkittiin valmistamalla geeli, jonka beetaglukaania lämmitettiin levyllä 15 minuutin ajan 37 °C:een asti, ja sitten yhdistettiin gelatinoidun vehnätärkkelyksen kanssa. Lisäksi valmistettiin beetaglukaania 0,5 % kontrollinäyte samalla tavalla.

Kaikki näytteet valmistettiin kolmena rinnakkaisena ja kustakin erästä valettiin kaksi muottia, joihin punnittiin noin 3 g geeliä. Geelejä varastoitettiin +5 °C:ssa ja niiden viskoelastisuutta tutkittiin oskilloivalla mittauksella ajankohtana 20 h.

3.1.2.4 Geeliominaisuuksien tutkiminen

Oskilloivaa mittausta käytetään materiaalin viskoelastisten ominaisuuksien tutkimiseen. Geeleistä määritettiin varastomoduuli G' ja häviömoduuli G'' reometrillä (Haake Mars 40, Saksa). Mittauksissa käytettiin levy-levy koetinta (P35/Ti, Thermo Scientific, Saksa). Leikkausjännitys (engl. shear stress) määritettiin kullekin näytteelle erikseen suorittamalla amplitudipyhäisy 1 Hz:n leikkausnopeudella ja määrittämällä lineaarinen viskoelastinen alue, jolta valittiin taajuuspyhäisyssä käytetty arvo. Taajuuspyhäisy-mittauksessa oskilloitiin näytettä vaihtuvalla taajuudella suoritetuissa mittauksissa taajuuden ollessa aluksi 0,03 Hz ja nousten asteittain 10 Hz:iin asti, suhteellinen muodonmuutos pidettiin vakiona ja mitattiin sen leikkausjännityksen määrää, jolla saatiin aikaan haluttu muodonmuutos kullakin taajuudella.

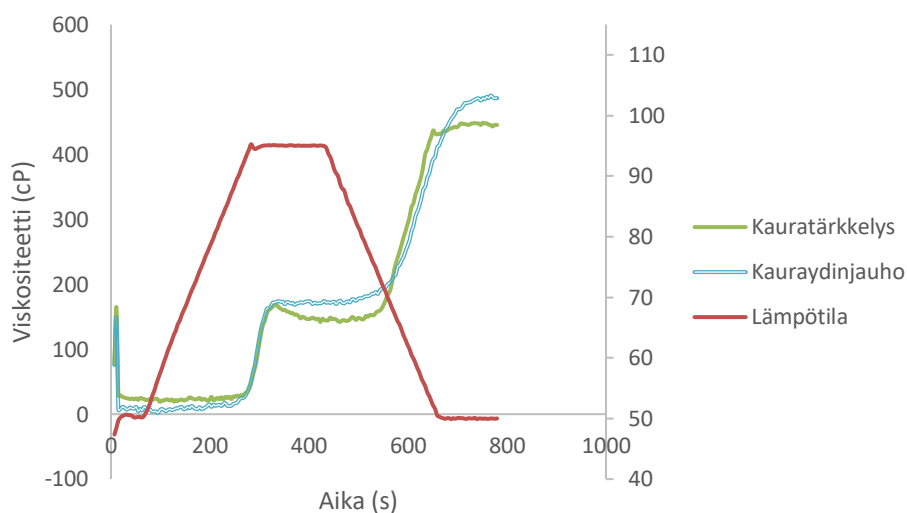
Beetaglukaani-liuoksista mitattiin sekä viskositeetti että varasto- ja häviömoduulit. Kaikista näytteistä laskettiin kolmesta toistosta keskiarvot ja keskiarvon keskivirheet.

3.2 Tulokset

3.2.1 Kauraydinjauhon ja kauratärkkelyksen viskositeetit, sekä geelien viskoelastiset ominaisuudet

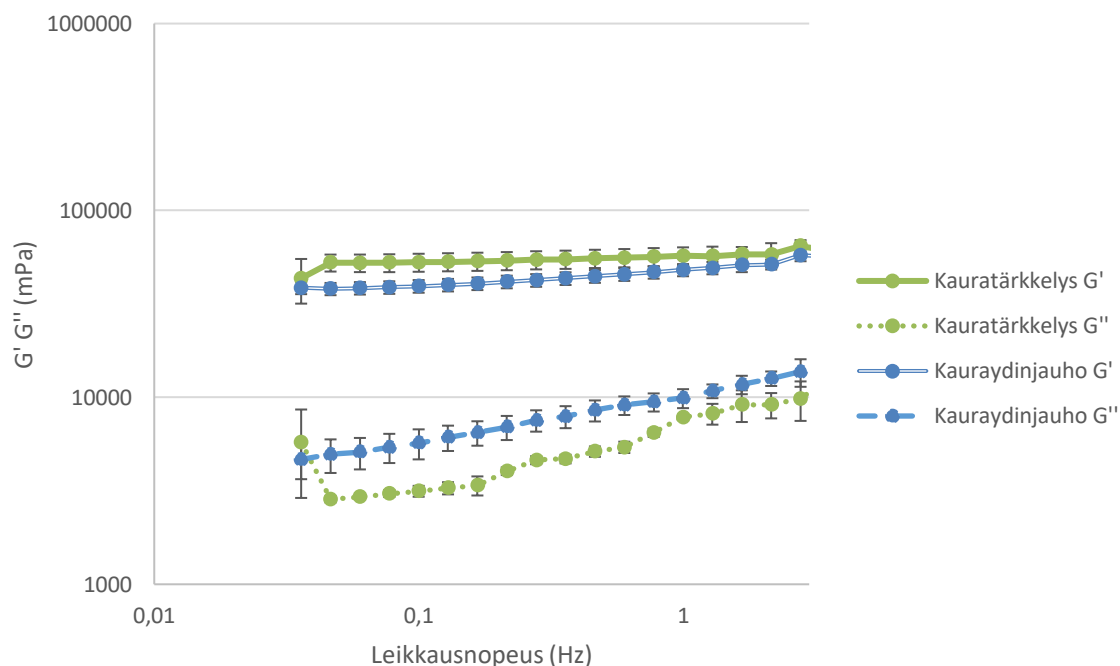
RVA:lla 95 °C:ssa kauraydinjauhosta ja kauratärkkelyksestä valmistettujen liuosten liisteröitymiskäyrässä viskositeetin muuttuminen lämpötilan muuttuessa erosi toisistaan

(kuva 10). Kauraydinjauhosta valmistetulla liuoksella ei ollut havaittavissa rikkoutumis - ilmiötä, kauratärkkelyksen rikkoutuminen oli 29 cP kun kauraydinjauhon rikkoutuminen oli 12 cP. Kauraydinjauhon loppuviskositeetti nousi korkeammaksi (490 cP kuin kauratärkkelyksestä valmistetulla liuoksella (450 cP). Myös palautuminen (engl. setback) oli kauraydinjauholla (320 cP) kauratärkkelystä (310 cP) suurempi.



Kuva 10. Kauratärkkelyksen viskositeetti verrattuna kauraydinjauhon viskositeettiin.

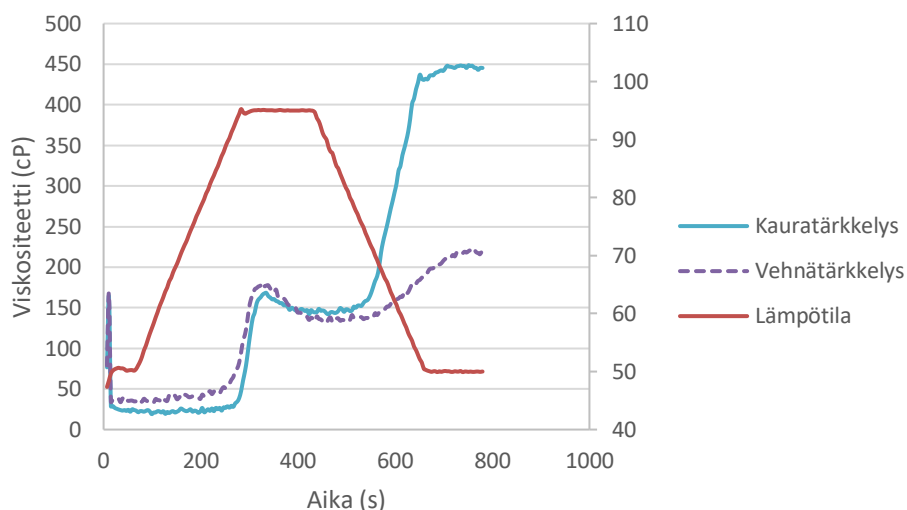
Kauraydinjauhosta RVA:lla valmistetun geelin viskoelastiset ominaisuudet olivat samankaltaisia kauratärkkelyksestä valmistetun geelin kanssa (kuva 11). 1 Hz leikkausnopeudella kauraydinjauhon G' oli 48000 mPa ja G'' 9900 mPa, ja kauratärkkelyksen G' oli 57000 mPa ja G'' 7800 mPa.



Kuva 11. Kauratärkkelyksestä valmistetun geelin viskoelastiset ominaisuudet verrattuna kauraydinjauhosta valmistetun geelin viskoelastisiin ominaisuuksiin leikkausnopeuden funktiona.

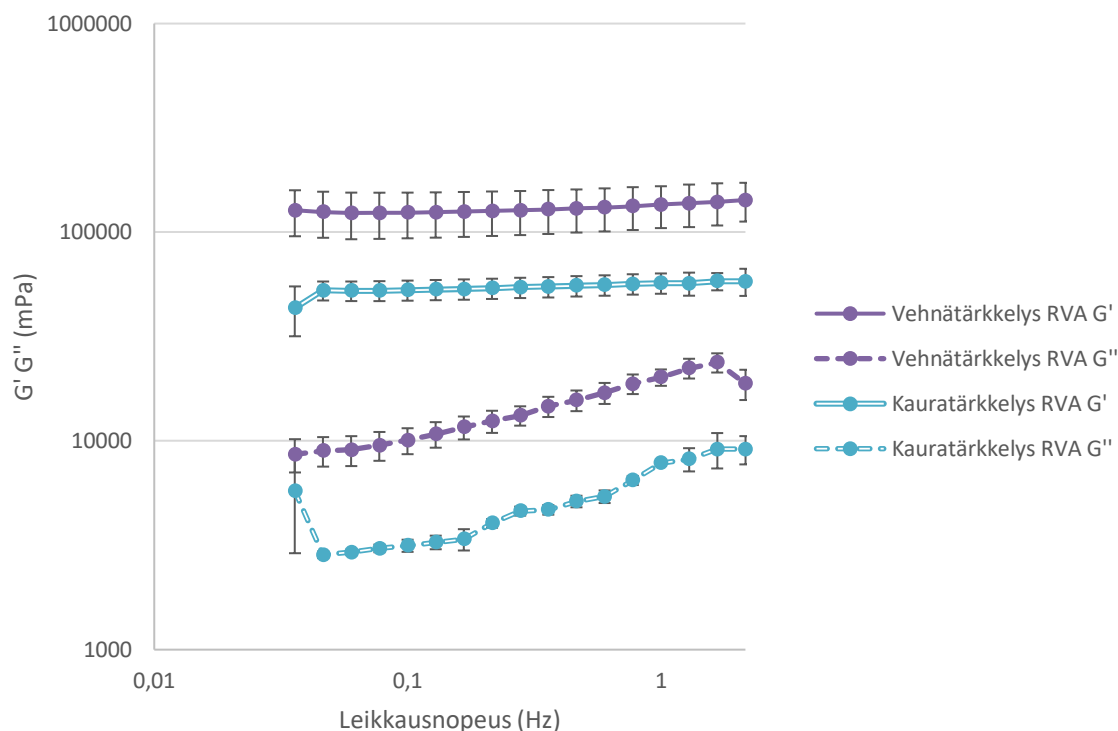
3.2.2 Vehnä- ja kauratärkkelysnäytteiden geeliytymiserot

RVA:lla valmistettujen tärkkelysliuosten viskositeetin kehitymisessä ajan funktiona nähtiin selvät erot kaura- ja vehnätärkkelyksen välillä (kuva 12). Kauratärkkelys muodosti viskoosisemman liuoksen kuin vehnätärkkelys, kauratärkkelyksen loppuviskositeetti oli 450 cP, kun vehnätärkkelyksen loppuviskositeetti oli 220 cP. Lisäksi rikkoutuminen erosi vehnätärkkelyksellä ja kauratärkkelyksellä, vehnätärkkelyksellä se oli 53 cP ja kauratärkkelyksellä 29 cP. Vehnä- ja kauratärkkelyksestä 80 °C:ssa valmistetuissa näytteissä ei havaittu liisteröitymistä (ei kuvaa).



Kuva 12. Kauratärkkelyksestä 95 °C:ssa valmistetun liuoksen viskositeetti ajan funktiona verrattuna vehnätärkkelyksestä valmistetun liuoksen viskositeettiin. Kauratärkkelyksestä valmistetun liuoksen loppuviskositeetti oli noin kaksinkertainen verrattuna vehnätärkkelyksestä valmistetun liuoksen viskositeettiin.

Vehnätärkkelyksestä ja kauratärkkelyksestä valmistettujen geelien oskillointimittauksissa nähtiin odotetusti vehnätärkkelysgeelin olevan kauratärkkelysgeeliä vahvempi (kuva 13). Kummankaan geelin varastomoduuli ei muuttunut leikkausnopeuden kasvaessa, mutta geelien häviömoduulit suurenevät leikkausnopeuden kasvaessa. Leikkausnopeudella 1 Hz vehnätärkkelysgeelin G' oli 140000 mPa ja G'' 20000, kun kauratärkkelyksen arvot olivat G' 57000 mPa ja G'' 7800 mPa.



Kuva 13. Vehnätärkkelyksestä ja kauratärkkelyksestä valmistettujen geelien varastomoduuli ja häviömoduuli leikkausnopeuden funktiona. Vehnätärkkelyksestä valmistettu geeli oli kauratärkkelyksestä valmistettua geeliä vahvempi.

3.2.3 Beetaglukaanin vaikutus tärkkelyksen viskositeettiin ja geeliin

Beetaglukaanin viskositeettia ja geeliytymistä tutkittiin ensin ilman tärkkelyksen lisäämistä. Mitattaessa pelkkää 0,5-prosenttista beetaglukaania RVA:lla, beetaglukaani ei liennut kunnolla, eikä sekoittunut tasaisesti. Siten myöskään geelirakennetta ei muodostunut ja näin ollen näistä näytteistä ei mitattu geeliominaisuuksia.

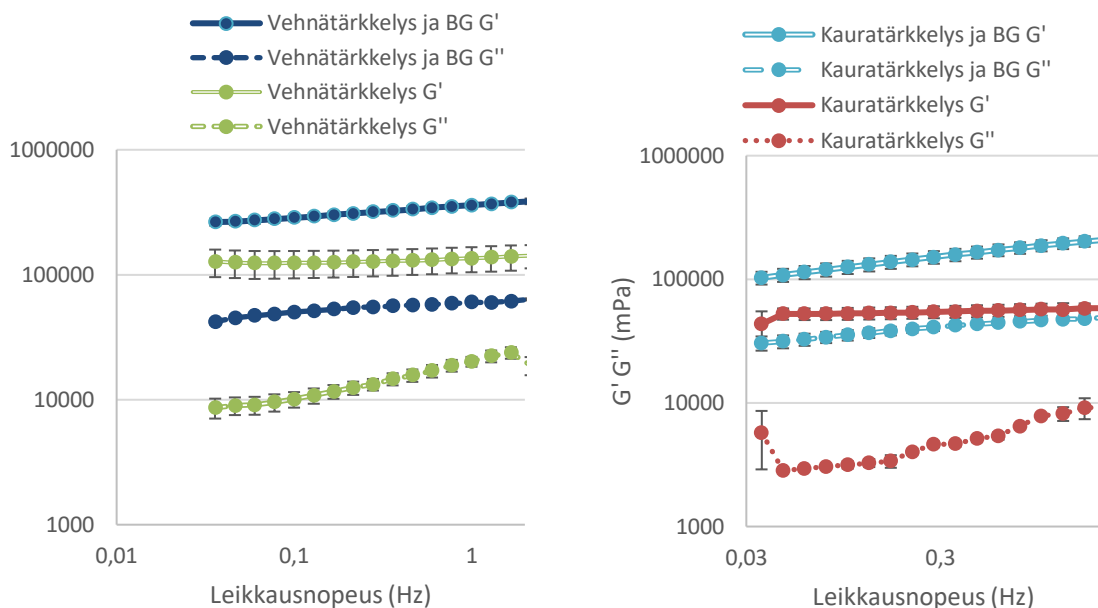
Beetaglukaanista lämpölevyllä valmistetut, 37 °C:ssa ja 85 °C:ssa kuumennetut 0,5 % liuokset eivät muodostaneet geeliä yhdessä yössä kylmäsäilytyksessä. Niistä mitattiin kartio-levy koettimella mitattavan viskositeetin lisäksi myös levy-levy koettimella varastomoduuli ja häviömoduuli. Häviömoduuli oli varastomoduulia suurempi kaikilla taajuuksilla sekä 37 °C:ssa että 85 °C:ssa liuotetulla beetaglukaanilla (kuva liitteissä). Sekä häviömoduuli että varastomoduuli suurenevät taajuuden kasvaessa. Lämpötilassa 37 °C liuotetusta beetaglukaanista muodostui hieman enemmän geelirakennetta, kuin lämpötilassa 85 °C liuotetusta beetaglukaanista. Viskositeettimittauksissa lämpötilassa 37 °C liuotetulla beetaglukaanilla oli hieman hystereesiä, mitä 85 °C:ssa liuotetulla beetaglukaanilla ei näkynyt ollenkaan. Beetaglukaani, joka oli lämmitetty 37 °C:een asti 15 minuutin ajan ei myöskään muodostanut geeliä.

Vehnätärkkelyksen ja beetaglukaanin sekä kauratärkkelyksen ja beetaglukaanin kuivana sekoitettujen ja RVA:lla kuumennettujen liuosten viskositeetin muuttuminen ajan funktiona poikkesi pelkän tärkkelyksen muodostaman liuoksen viskositeetista (taulukko 3). Loppuviskositeetti oli molemmilla tärkkelyksillä noin kaksinkertainen beetaglukaanin kanssa verrattuna näytteisiin ilman lisättyä beetaglukaania. Vehnätärkkelyksestä beetaglukaanin kanssa valmistetun kuivasekoituksen loppuviskositeetti oli 630 cP, ja kauratärkkelyksen ja beetaglukaanin kuivasekoituksen 1400 cP. Palautuminen oli kauratärkkelyksestä valmistetulla kuivasekoituksella huomattavasti suurempi, 860 cP, kun vehnätärkkelyksestä valmistetulla kuivasekoituksella se oli 260 cP. Beetaglukaania sisältävien näytteiden huippuviskositeetti saavutettiin hieman myöhemmin, kuin beetaglukaania sisältämättömien näytteiden. Vehnätärkkelyksestä valmistetuilla näytteillä ero oli 0,4 minuuttia ja kauratärkkelyksestä valmistetuilla näytteillä 1 minuutti.

Taulukko 3. Vehnätärkkelyksen, kauratärkkelyksen, vehnätärkkelyksen ja beetaglukaanin kuivaseoksen sekä kauratärkkelyksen ja beetaglukaanin kuivaseoksen viskositeetti RVA:lla.

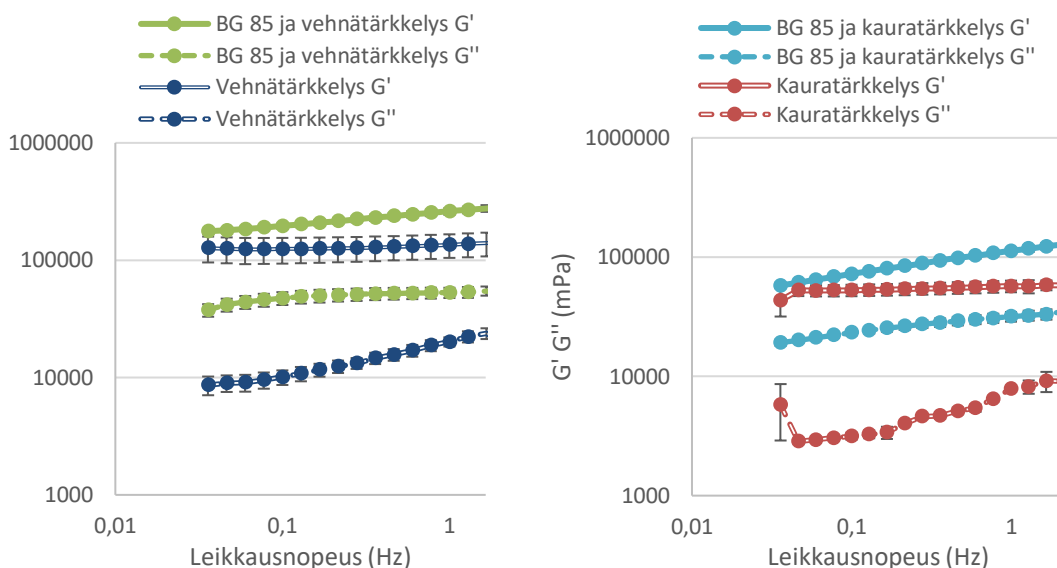
Näyte	Huippuviskositeetti (cP)	Rikkoutuminen (cP)	Loppuviskositeetti (cP)	Palautuminen (cP)	Huippuaika (min)
Vehnätärkkelys	180	53	220	92	5,4
BG ja vehnätärkkelys	550	180	630	260	5,8
Kauratärkkelys	170	29	450	300	5,6
BG ja kauratärkkelys	580	38	1400	860	6,6

Tärkkelyksen ja beetaglukaanin kuivasekoituksista valmistettujen geelien vahvuudessa oli samansuuntaiset erot kauratärkkelyksestä valmistetuilla geeleillä verrattuna vehnätärkkelyksestä valmistettuihin geeleihin (kuva 14). Geeleissä oli paljain silmin nähtävissä olevia kirkkaita rakeita, joiden koostumusta ei saatu selvitettyä. Niitä kutsutaan jatkossa partikkeleiksi. Geelirakenteen havaittiin olevan vahvempi beetaglukaania sisältävissä geeleissä. Leikkausnopeuden kasvaessa kauratärkkelyksestä valmistettujen geelien varastomoduuli kasvoi, kun taas häviömoduuli pysyi tasaisempana ainakin kauratärkkelyksen ja beetaglukaanin kuivasekoituksesta valmistetuilla geeleillä. Leikkausnopeudella 1 Hz beetaglukaania sisältävän geelin G' oli 57000 mPa ja G'' 7800 mPa kauratärkkelyksestä ja beetaglukaanista valmistetulla geelillä. Beetaglukaania sisältävän vehnätärkkelysgeelin G' oli 360000 mPa ja G'' 60000 mPa leikkausnopeudella 1 Hz.



Kuva 14. Vasemmalla kauratärkkelyksen ja beetaglukaanin kuivasekoituksesta RVA:lla valmistetun geelin viskoelastiset ominaisuudet leikkausnopeuden funktiona verrattuna pelkästä kauratärkkelyksestä valmistetun geelin ominaisuuksiin. Oikealla vastaavasti vehnätärkkelyksestä ja beetaglukaanista valmistetut näytteet.

Erikseen liuotettujen vehnätärkkelyksen ja beetaglukaanin seoksesta valmistettu geeli oli vahvempi, kuin pelkästä vehnätärkkelyksestä valmistettu geeli (kuva 15). Beetaglukaanin sisältävän geelin varastomoduuli kasvoi hieman leikkausnopeuden kasvaessa, mutta kaikilla mitatuilla leikkausnopeuksilla varastomoduuli oli suurempi kuin pelkästään vehnätärkkelystä sisältävän geelin varastomoduuli. Leikkausnopeudella 1 Hz erikseen liuotettujen vehnätärkkelyksen ja beetaglukaanin sekoituksesta valmistetun geelin G' oli 260000 mPa ja G'' 53000 mPa. Kauratärkkelyksestä valmistetuilla näytteillä erot olivat hyvin samantyyppiset kuin vehnätärkkelyksestä valmistetuilla näytteillä. Beetaglukaanin sisältävän geelin G' oli 110000 mPa ja G'' 32000 mPa.

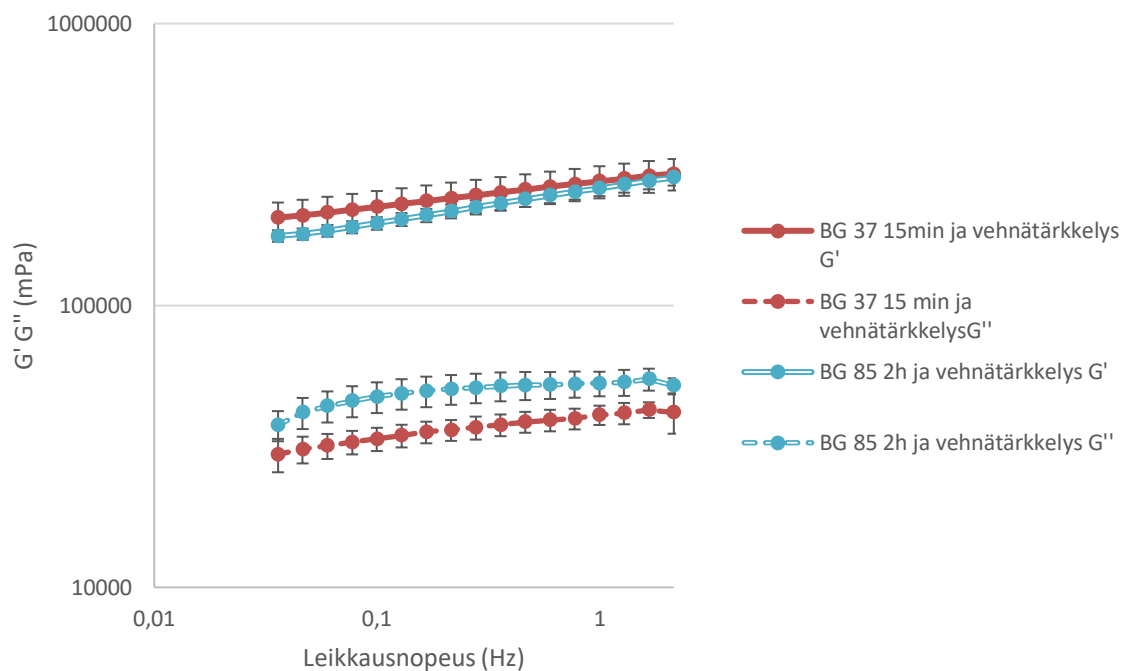


Kuva 15. Vasemmalla beetaglukaanin vaikutus geelin vahvuuteen kauratärkkelyksestä valmistetuilla geeleillä leikkausnopeuden funktiona. Oikealla erikseen liuotetuista beetaglukaanista ja vehnätärkkelyksestä valmistetun geelin viskoelastiset ominaisuudet verrattuna vehnätärkkelyksestä valmistetun geelin ominaisuuksiin leikkausnopeuden funktiona.

Vehnätärkkelyksestä valmistettiin RVA:lla liuos, jonka pitoisuus oli niin pieni, ettei kunnon geeliä muodostunut. Sitten tehtiin sama, mutta osa tärkkelyksestä korvattiin beetaglukaanilla säilyttäen sama kuiva-ainepitoisuus. Beetaglukaanilla täydennetty näyte muodosti geelin (kuva liitteissä), jonka G' oli 36000 mPa ja G'' 14000 mPa leikkausnopeudella 1 Hz, kun pelkkää tärkkelystä sisältävällä geelillä G' oli 7100 mPa ja G'' oli 1700 mPa.

3.2.4 Beetaglukaanin liuotusajan vaikutus

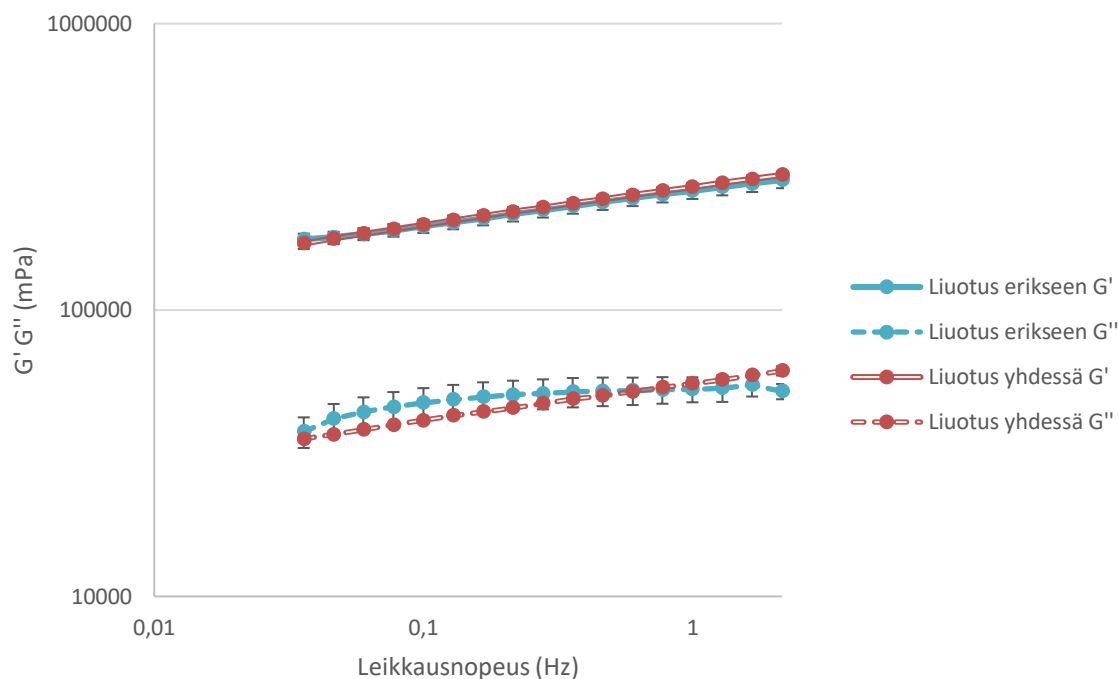
37 °C:een asti 15 minuutin ajan pelkässä vedessä lämmitetyn ja gelatinoidun vehnätärkkelyksen seoksesta valmistetun geelin viskoelastiset ominaisuudet olivat hyvin samankaltaisia kaksi tuntia 85 °C:ssa liuotetun beetaglukaanin ja gelatinoidun vehnätärkkelyksen seoksesta valmistetun geelin kanssa (kuva 16). Ensin mainitun geelin G' oli 280000 mPa ja G'' 41000 mPa leikkausnopeudella 1 Hz. Koska 15 minuutin ajan kuumennetun G' on suurempi kuin 2 h kuumennetun G' , ja G'' pienempi kuin 2 h kuumennetun G'' , on mielenkiintoista verrata G' :n ja G'' :n suhteita, eli $\tan \delta$:a. $\tan \delta$ 15 minuuttia kuumennetulla näytteellä oli noin 0,15, kun taas pidempään liuotetusta beetaglukaanista valmistetulla geelillä $\tan \delta$ leikkausnopeudella 1 Hz oli 0,2.



Kuva 16. 37 °C:een asti 15 minuutin ajan lämmitetyn beetaglukaanin ja gelatinoidun tärkkelyksen seoksesta valmistetun geelin viskoelastiset ominaisuudet leikkausnopeuden funktiona verrattuna geeliin, joka on valmistettu liuottamalla beetaglukaani kahden tunnin ajan 85 °C:ssa ja sekoitettu gelatinoituun vehnätärkkelykseen.

3.2.5 Beetaglukaanin ja tärkkelyksen liuotus yhdessä ja erikseen

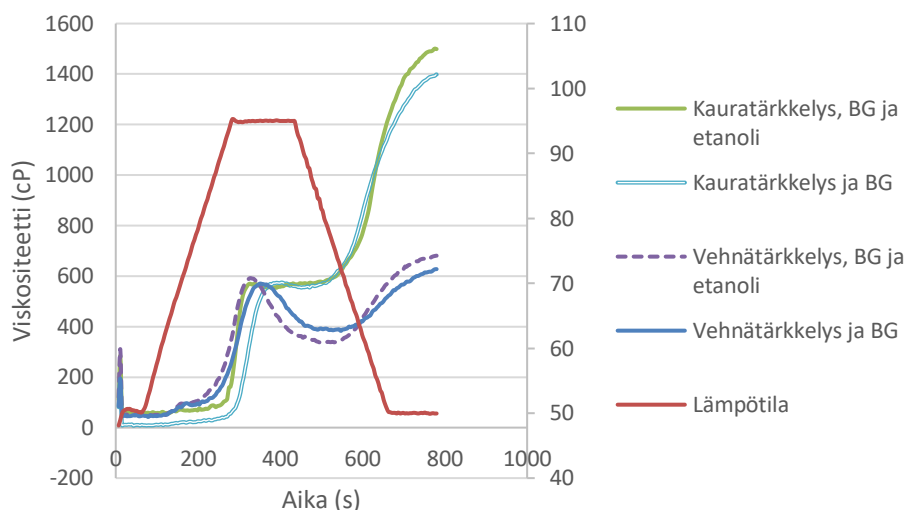
Tutkimuksissa haluttiin selvittää, miten erikseen liuotetun beetaglukaanin ja tärkkelyksen muodostama geeli eroaa yhdessä liuotettujen beetaglukaanin ja tärkkelyksen muodostamasta geelistä. Kaikkia näytteitä pidettiin kuumennuslevyllä kaksi tuntia. Varastomoduulit ja häviömoduulit olivat geeleillä suunnilleen yhtä suuria (kuva 17). Leikkausnopeudella 1 Hz lämpölevyllä kuivasekoituksesta valmistetun geelin G' oli 270000 mPa ja G'' 55000 mPa.



Kuva 17. Erikseen ja yhdessä liuotettujen vehnätärkkelys- ja beetaglukaanigeelien viskoelastisten ominaisuuksien vertailu leikkausnopeuden funktiona. Erikseen liuotettu näyte oli 85 °C:ssä liuotettu beetaglukaanin ja gelatinoidun tärkkelyksen sekoituksesta valmistettu geeli, ja yhdessä liuotettu näyte oli lämpölevyllä 2 tuntia ensin 95 °C:ssä ja sitten 85 °C:ssä kuumentamalla valmistettu geeli.

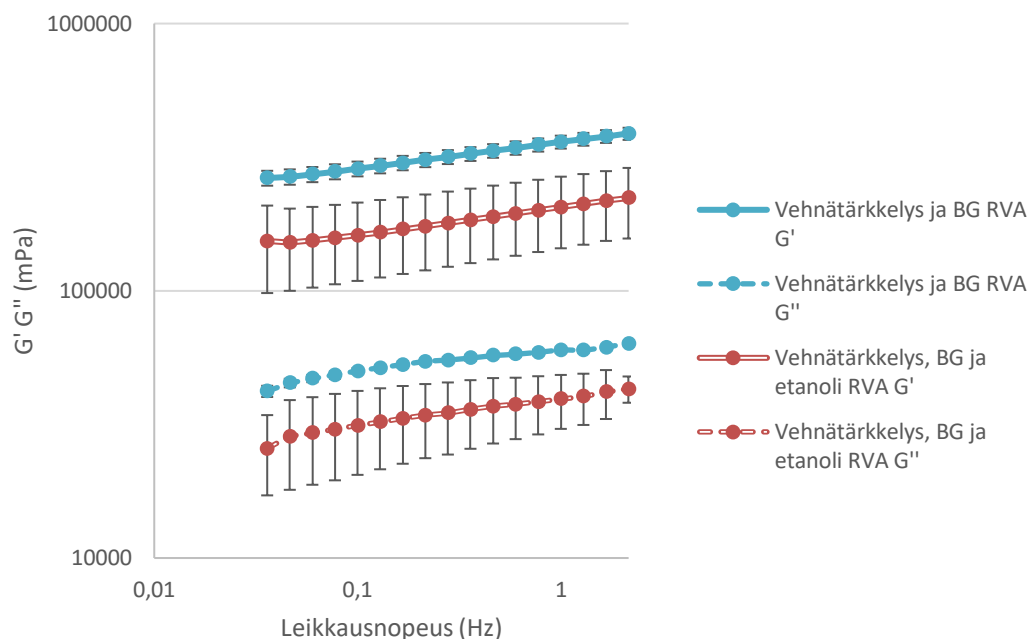
3.2.6 Etanolin vaikutus liuoksien viskositeettiin ja geelien ominaisuuksiin

Beetaglukaanin paremman liukenemisen vaikutusta geelin rakenteeseen etanolin avulla haluttiin selvittää tarkemmin. Lisäämällä etanolia beetaglukaanin joukkoon ennen veden ja tärkkelyksen lisäämistä saatiin huippuviskositeettia ja loppuviskositeettia hieman suuremmaksi verrattuna kuivasekoituksen viskositeettiin (kuva 18). Ilmiö esiintyi sekä vehnätärkkelyksellä että kauratärkkelyksellä valmistetuissa näytteissä. Loppuviskositeetti kauratärkkelyksestä valmistetulla etanolia sisältävällä liuksella oli 1500 cP ja vehnätärkkelyksestä valmistetulla etanolia sisältävällä liuksella 730 cP. Ilman etanolia valmistetuilla liuksilla loppuviskositeetit olivat vastaavasti 1400 cP ja 630 cP. Eli molemmilla tärkkelyksillä loppuviskositeetti kohosi noin 100 cP ylemmäksi lisättäessä beetaglukaanin sekaan etanolia.

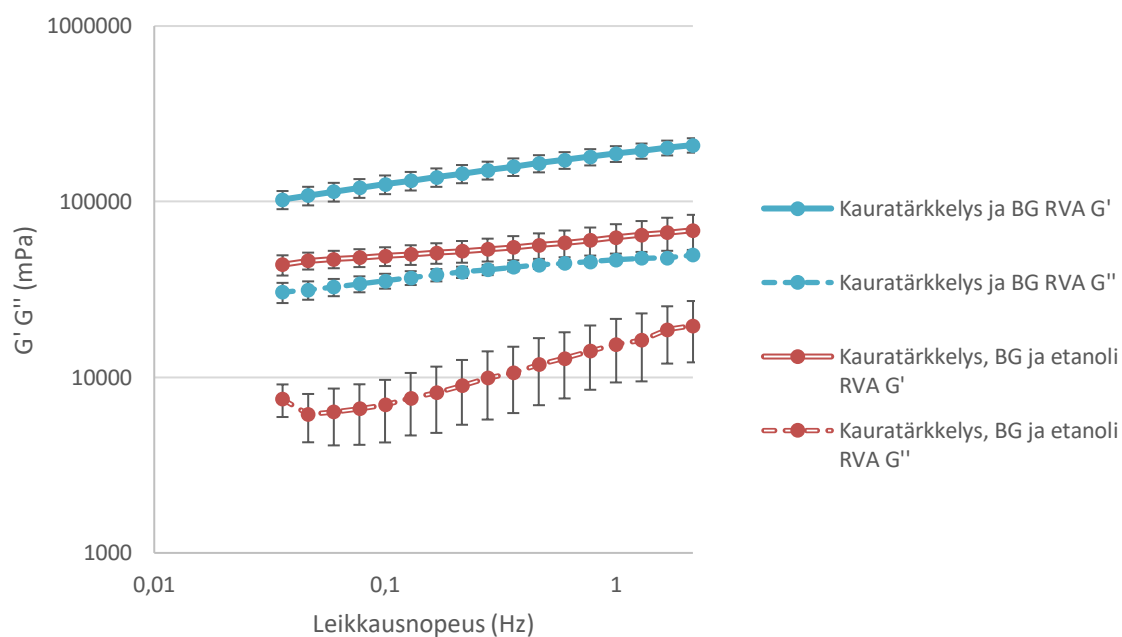


Kuva 18. Etanolin vaikutus tärkkelyksen ja beetaglukaanin kuivasekoituksista valmistettujen liuoksien viskositeettiin. Etanolilla oli vähän viskositeettia lisäävä vaikutus.

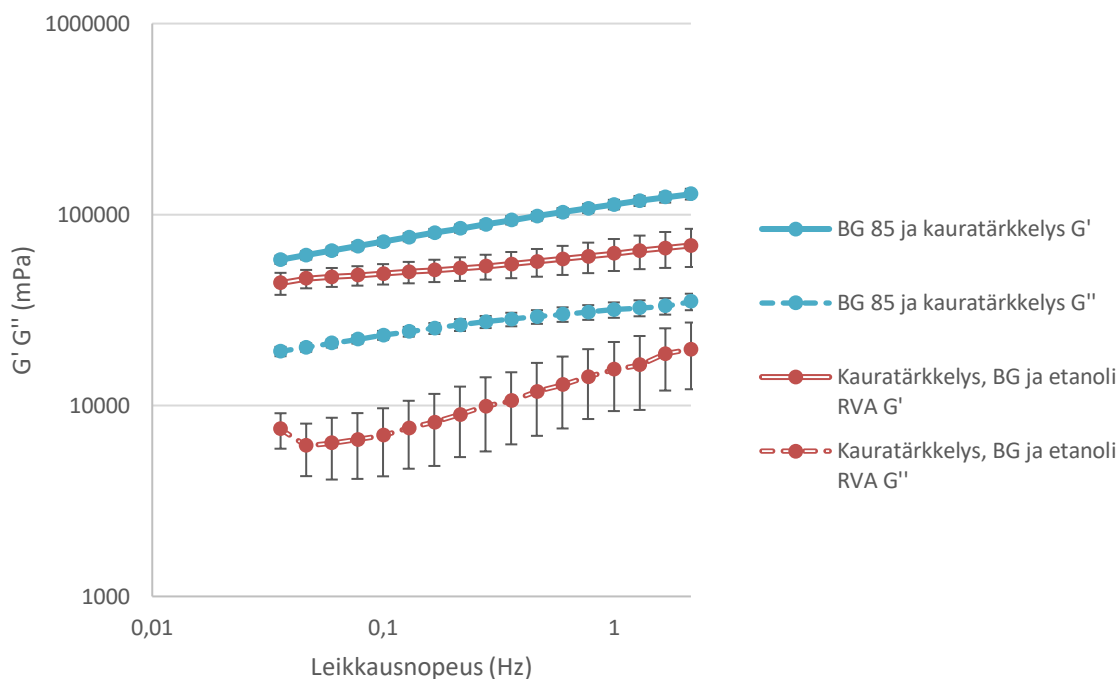
Geelien oskillointimittauksissa etanolilla vaikutti olevan heikentävä vaikutus geelin rakenteeseen sekä vehnä- että kauratärkkelyksestä valmistetuissa geeleissä (kuva 19 ja 20). Kun verrattiin erikseen liuotetuista beetaglukaanista ja tärkkelyksestä valmistettua geeliä kuivasekoituksesta etanolin kanssa valmistettuun geeliin, huomattiin, että kuivasekoituksesta etanolin kanssa RVA:lla valmistetun geelin rakenne oli heikompi (kuva 21). Leikkausnopeudella 1 Hz etanoliin esiliuotetun beetaglukaani-vehnätärkkelysgeelin G' oli 210000 mPa ja G'' 39000 mPa, sekä kauratärkkelys-geelin G' oli 63000 mPa ja G'' 15000 mPa.



Kuva 19. Etanolin vaikutus vehnätärkkelyksestä valmistettuun beetaglukaania sisältävään geeliin. RVA:lla ilman etanolia valmistettu geeli oli vahvempi, kuin geeli, joka valmistettiin lisäämällä etanolia beetaglukaaniin ennen sekoittamista veden ja tärkkelyksen kanssa, ja sitten käyttämällä RVA:ta.



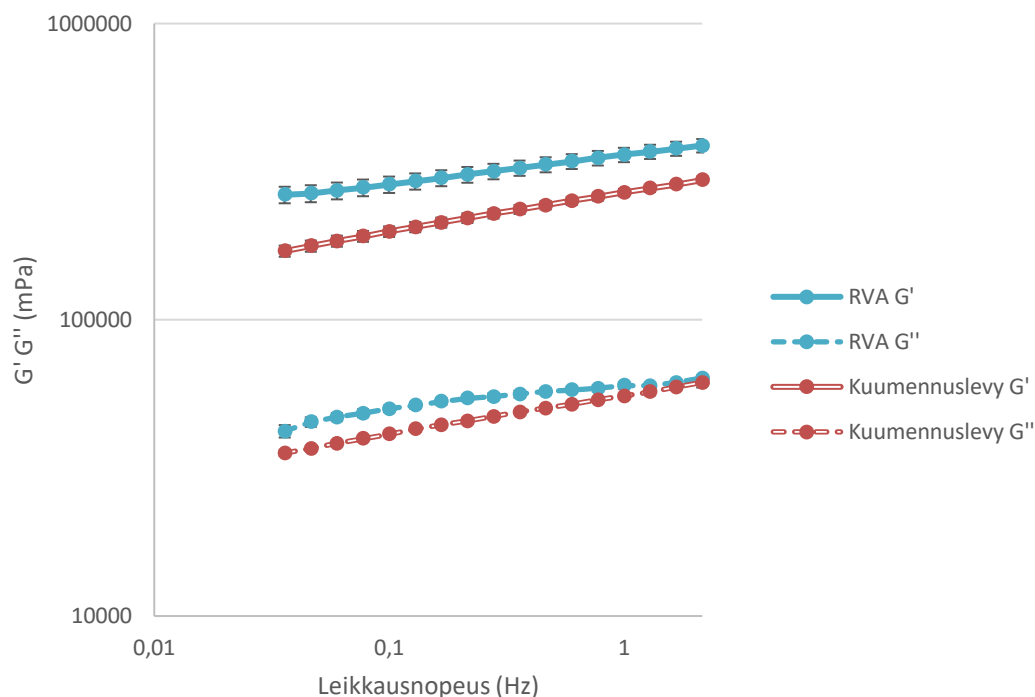
Kuva 20. Etanolin vaikutus kauratarätkkelyksestä valmistettuihin beetaglukaania sisältäviin geeleihin. Etanoli sekoitettiin ensin beetaglukaaniin, sitten lisättiin vesi, ja lopuksi tärkkelys ennen RVA:lla kuumentamista.



Kuva 21. Erikseen liuotetusta beetaglukaanista ja gelatinoidusta kauratärkkelyksestä valmistetun geelin viskoelastiset ominaisuudet verrattuna kuivasekoituksesta etanolin kanssa RVA:ssa valmistetun geelin ominaisuuksiin. Etanolilla vaikutti olevan geeliä heikentävä vaikutus, koska ilman etanolia RVA:ssa valmistettu geeli oli vahvempi, kuin erikseen liuotetun beetaglukaanin ja tärkkelyksen muodostama geeli.

3.2.7 Liuotusajan vaikutus geeliin

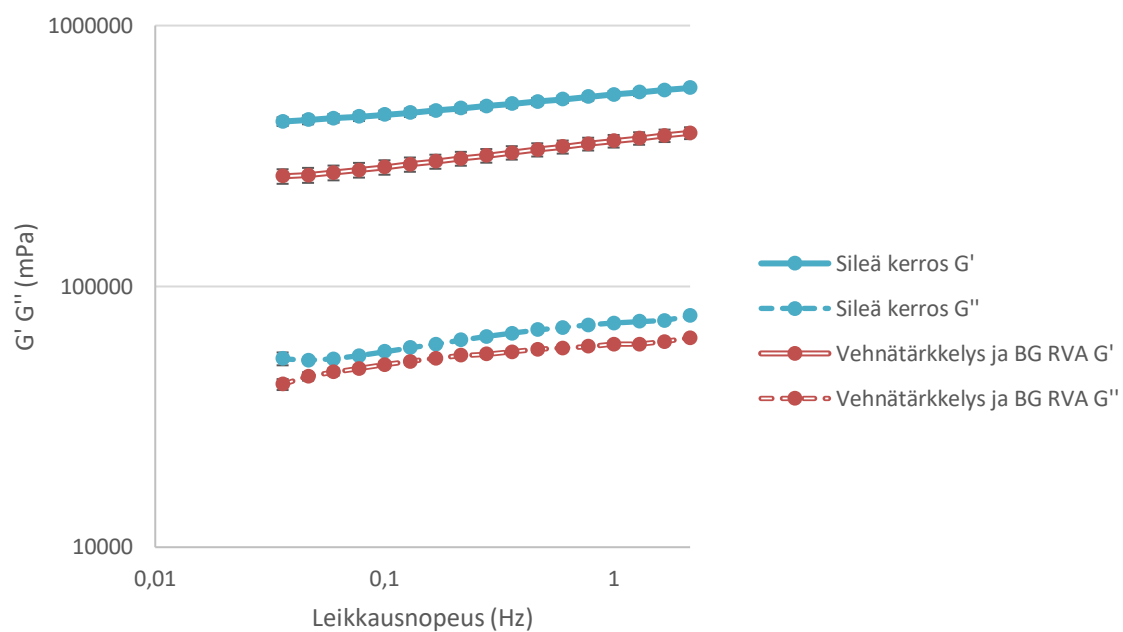
RVA:lla vehnätärkkelyksen ja beetaglukaanin kuivasekoituksesta valmistetut geelit olivat hieman vahvempia kuin kuumennuslevyllä kahden tunnin aikana valmistetut geelit (kuva 22). Leikkausnopeudella 1 Hz lämpölevyllä kuivasekoituksesta valmistetun geelin G' oli 270000 mPa ja G'' 55000 mPa, kun RVA:ssa valmistetulle geelille ne olivat 360000 mPa ja 60000 mPa vastaavasti.



Kuva 22. Liuotusajan vaikutus geelin viskoelastisiin ominaisuuksiin leikkausnopeuden funktiona. RVA:lla 13 minuuttia kestäväällä ohjelmalla saatiin aikaan vahvempi geeli, kuin kuumennuslevyllä liuottamalla beetaglukaania ja tärkkelystä vedessä noin kahden tunnin ajan.

3.2.8 Partikkeleiden vaikutus geeliin

RVA:lla valmistetuissa geeleissä olevien partikkeleiden vaikutusta arvioitiin mittaamalla sentrifugoinnin jälkeen putken alemmaksi kerrokseksi jääneen kirkkaan, tasaisen geelin G' ja G'' (kuva 23). Leikkausnopeudella 1 Hz geelin G' oli 540000 mPa ja G'' 72000 mPa. Verrattuna sentrifugoimattomaan geeliin partikkeleista puhdistettu geeli oli vahvempi.



Kuva 23. Partikkeleiden vaikutus geelin vahvuuteen. Partikkeleista sentrifugoimalla puhdistettu sileä geeli oli vahvempi kuin partikkeleita sisältävä geeli.

3.3 Pohdinta

3.3.1 Kauraydinjauhon puhdistamisen vaikutus viskositeettiin

Kauratärkkelyksellä viskositeetin pienentymä oli noin kaksinkertainen verrattuna kauraydinjauhon viskositeetin vastaavaan arvoon (29 cP kauratärkkelyksellä ja 12 cP kauraydinjauholla). Jiang ym. (2016) raportoivat härkäpapujauhojen viskositeettimittauksissa rikkoutumisilmiön puuttumisesta ja selittivät pientä arvoa proteiinien ja lipidien vaikutuksilla. Proteiinien vuorovaikutukset tärkkelyksen kanssa voivat muuttaa jauhojen liisteröitymisominaisuuksia. Tärkkelysjuvästen ympärille on voinut muodostua verkostoa, joka estää juvästen hajoamista. Myös Chung ym. (2008) huomasivat tutkimuksissaan, että papujauhoilla ei ollut rikkoutumista, minkä aiheuttajaksi ehdotettiin pientä tärkkelyspitoisuutta sekä proteiinin, lipidien ja kuidun vaikutusta. Tässäkin tutkimuksessa tärkkelyksen pienempi osuus sekä proteiinien, lipidien ja kuidun suurempi määrä voi selittää eroja rikkoutumis -viskositeetissa. Edellä mainitut komponentit ovat saattaneet häiritä tärkkelysjuvästen hajoamista eikä viskositeetti siksi ole päässyt pienenemään. Erot proteiini- ja lipidikomponenttien määrissä sekä erilaisen verkstorakenteen muodostumisessa voivat olla myös kauraydinjauhon suuremman loppuviskositeetin aiheuttajana. Alkuperäinen kauraydinjauho sisälsi beetaglukaania noin 2 %, jolla oli vaikutusta varsinkin loppuviskositeettiin.

3.3.2 Vehnätärkkelyksen ja kauratärkkelyksen erojen vaikutus viskositeettiin

Vehnätärkkelysliuoksen huippuviskositeetti oli korkeampi kuin kauratärkkelyksen, mutta loppuviskositeetti oli vain noin puolet kauratärkkelyksen loppuviskositeetista, ja beetaglukaania lisäämisen jälkeen erot vehnä- ja kauratärkkelyksen loppuviskositeetissa olivat suunnilleen samassa suhteessa toisiinsa kuin ilman beetaglukaania valmistetuissa näytteissä. Vehnätärkkelys oli kaupallista laatua, ja kauratärkkelys itse puhdistettua, joten kauratärkkelyksessä on mahdollisesti ollut enemmän epäpuhtauksia kuin vehnätärkkelyksessä, jolloin vehnätärkkelyksessä on ollut enemmän tärkkelystä verrattuna kauratärkkelykseen. Epäpuhtaudet saattoivat suurentaa kauratärkkelyksen liisteröitymislämpötilaa vähän ja pienentää rikkoutumisviskositeettia verrattuna vehnätärkkelykseen. Myös kauratärkkelyksen loppuviskositeetissa tärkkelysproteiinikompleksit saattoivat suurentaa viskositeettia. Lim ym. (1992) määrittivät työssä käytetyllä puhdistusmenetelmällä saadun kauratärkkelyksen sisältämät

epäpuhtauksien pitoisuudet, jotka olivat 1,3 % proteiinia, 0,5 % tuhkaa ja 1,9 % lipidejä, joilla on vaikutusta viskositeettiin.

Kauratärkkelys käyttäytyy eri tavalla kuumennettaessa vedessä kuin muut tärkkelykset. Kauratärkkelyksen amyloosi ja amylopektiini poistuvat jyväsistä samanaikaisesti, kun vehnätärkkelyksellä amyloosi poistuu ensin (Mua ja Jackson 1995).

3.3.3 Beetaglukaanin vaikutus tärkkelysliuoksien viskositeettiin

Beetaglukaania sisältävillä näytteillä loppuviskositeetti nousi noin kaksinkertaiseksi verrattuna liuokseen, joka oli valmistettu ilman beetaglukaania. Tärkkelyksen ja galaktomannaanin synergisistä vaikutuksista liuoksen viskositeettiin on saatu vastaavia tuloksia (Alloncle ym. 1989). Ilmiön hypoteesiksi esitettiin, että galaktomannaani sijaitsee liuoksen jatkuvassa faasissa, jonka tilavuus pienenee tärkkelysjyvästen turvotessa, ja jatkuvan faasin tilavuuden pienentyessä galaktomannaanin konsentraatio kasvoi, mistä seurasi galaktomannaanin aiheuttama viskositeetin nouseminen. Samanlaisia päätelmiä teki myös Li ym. (2016) tutkittuaan vehnätärkkelyksen ja beetaglukaanin yhteisvaikutuksia RVA:lla. Edellä mainitusta hypoteesista ei kuitenkaan täysin selviä, miten tärkkelysjyvästen paisuminen vaikuttaisi loppuviskositeettiin, jolloin jyvät ovat rikkoutuneita. Myös Tolstoguzovin (2003) mukaan faasien eriytyminen johtaa kunkin polymeerin konsentraation suurenemiseen omassa faasissaan, mikä voisi selittää viskositeetin lisääntymistä. Toisaalta Brennan (2004) havaitsi 5 % ohran beetaglukaanilisäyksen johtavan viskositeetin pienenemiseen, mitä selitettiin sillä, että beetaglukaanin absorboitua vettä tärkkelys ei pysty liisteröitymään yhtä hyvin kuin ilman beetaglukaania. Brennanin tutkimusmateriaalina oli ohran beetaglukaani, kun taas muissa mainituissa tutkimuksissa käytettiin kauran beetaglukaania, ja pitoisuus oli kymmenkertainen tässä tutkimuksessa käytettyyn beetaglukaanin pitoisuuteen verrattuna. Beetaglukaanin molekyylipainolla on saattanut olla vaikutusta tulosten erilaisuuteen, ja Allonclen ym. (1989) hypoteesi sopisi selittämään myös tässä tutkimuksessa havaittua viskositeetin kasvua. Kriittisen konsentraation yläpuolella beetaglukaaniliuoksen viskositeetin on todettu nousevan jyrkästi (Doublier ja Wood 1995). Doublierin ja Woodin (1995) käyttämän kauramateriaalin ensimmäinen kriittinen konsentraatio oli 0,7. Lazaridou ym. (2004) puolestaan raportoi eri beetaglukaanien kriittisiksi konsentraatioiksi pitoisuuksia 0,19 – 1,58 % välillä. Tässä tutkimuksessa käytettiin beetaglukaania 0,5 %. Jos Allonclen ym. hypoteesi faasien konsentroitumisesta pätee tämän tutkimuksen näytteissä, niin beetaglukaanin pitoisuus on ollut todennäköisesti

kriittisen konsentraation yläpuolella ja viskositeetti on suurentunut voimakkaasti suhteellisen pienillä pitoisuuden muutoksilla.

3.3.4 Beetaglukaanin ja tärkkelyksen vaikutukset toisiinsa geelissä

Beetaglukaanin ja tärkkelyksen erikseen liuottamisen vaikutuksia geelirakenteeseen tutkittiin liuottamalla beetaglukaani ja tärkkelys lämpölevyillä erikseen, ja sitten yhdistämällä liuokset keskenään magneettisekoittajalla. Beetaglukaanilla ja tärkkelyksellä näytti olevan vaikutusta toisiinsa geelien vahvuutta vertailtaessa vain jompaakumpaa polysakkaridia sisältäviin geeleihin.

RVA:lla tärkkelyksen ja beetaglukaanin kuivasekoitustuksista valmistetut geelit olivat vahvempia kuin mikään muu näyte tässä tutkimuksessa. Vahvimman geelin muodostumiseen tarvittiin sitä, että tärkkelys ja beetaglukaani olivat samassa liuoksessa kuumennuksen aikana. Kun vertailtiin kuivasekoituksesta lämpölevyllä valmistettua geeliä RVA:lla valmistettuun geeliin, ei odotuksien vastaisesti saavutettu yhtä vahvaa geelirakennetta. Lämpölevyllä kuivasekoituksesta kahden tunnin ajan lämmitetyn geelin viskoelastiset ominaisuudet olivat suunnilleen samanlaiset erikseen liuottamalla valmistetun geelin kanssa, joten liuotustavalla ei ole merkitystä, jos beetaglukaani ei ole optimaalisesti liuotettu geeliytymisen kannalta. Mäkelä ym. (2017) havaitsivat beetaglukaanin geeliytymistä tutkiessaan, että pienillä konsentraatioilla kauran beetaglukaani muodostaa eniten rakennetta, kun se on liuotettu lämpötilassa 37 °C. Ilmiön selityksen arveltiin olevan beetaglukaanin osittaisessa liukenemisessä. Näiden tulosten perusteella voidaan ajatella, että RVA:lla tärkkelyksen liisteröityminen saadaan tapahtumaan niin nopeasti, ettei beetaglukaani ehdi liueta liikaa optimaalisen geeliytymisen saavuttamiseksi. Aiemmin on havaittu, että ohran beetaglukaanilla on vehnätärkkelyksen kanssa vuorovaikutuksia, jotka voidaan havaita oskilloivissa mittauksissa (Li ym. 2016). Elektronipyyhkäisymikroskooppikuvista nähtiin beetaglukaanin ja vehnätärkkelyksen seoksella joustavampi, paksumpi ja ehjempi verkosto kuin ilman beetaglukaania. Tuloksia ei suoraan voi verrata tässä tutkimuksessa saatuihin tuloksiin, koska tutkimusmateriaalina oli ohran beetaglukaani, jonka viskoelastiset ominaisuudet poikkeavat huomattavasti kauran beetaglukaanista. Lisäksi tutkimukset tehtiin tuoreilla näytteillä, joissa beetaglukaani ei juurikaan ole ehtinyt geeliytyä.

3.3.5 Partikkeleiden vaikutus geeliin

RVA:lla valmistetuissa geeleissä oli kirkkaina jyväsinä näkyviä liukenemattomia partikkeleita. Partikkelit poistamalla ja mittaamalla kirkkaan geelin viskoelastiset ominaisuudet kävi ilmi, että näkyvät liukenemattomat partikkelit heikensivät geeliä. Jos siis geelin vahvistuminen on ollut jonkinlaisten liukenemattomien hiukkasten ansiota, ei kyseessä olleet nämä näkyvät partikkelit, vaan jotkin pienemmät partikkelit. Näkyvien partikkeleiden koostumusta pyrittiin selvittämään jodivärjäyksen avulla. Lisäämällä partikkelin päälle jodia pinta värjäytyi tummaksi, mikä osoitti tärkkelyksen olevan ainakin osa partikkelin rakennetta. Mäkelän ym. (2017) tutkimuksessa beetaglukaanin geeliytymiseen johtanut osittainen liukeneminen ei ollut näkyvää. Liian matalan liuotuslämpötilan käytön seurauksena geelirakennetta ei muodostunut ja beetaglukaani jäi näkyviksi partikkeleiksi.

3.3.6 Etanolin vaikutus viskositeettiin ja geelin ominaisuuksiin

Lisättäessä etanolia beetaglukaaniin ennen sekoittamista veden ja tärkkelyksen kanssa saavutettiin vielä hieman suurempi loppuviskositeetti kuin ilman etanolin lisäämistä. Beetaglukaani mahdollisesti saatiin liukenemaan paremmin etanolin avulla, jolloin suuremman pitoisuuden myötä myös viskositeetti oli suurempi. Silti geelirakenne jäi vastoin odotuksia heikommaksi kuin ilman etanolia RVA:lla kuivasekoituksesta valmistetun geelin tai erikseen liuotetuista beetaglukaanista ja tärkkelyksestä valmistetun geelin. Tulos antaa viitteitä siitä, että etanoli on häirinnyt vuorovaikutuksien muodostumista jollain tavalla. Myös erikseen liuotettujen beetaglukaanin ja tärkkelyksen sekoituksissa beetaglukaanin liuottamiseen käytettiin etanolia, mutta liuosten yhdistämisvaiheessa suurin osa etanolista oli jo haihtunut pois. Etanolia sisältävien RVA:lla valmistettujen geelien keskiarvon keskivirheet olivat muihin näytteisiin verrattuna suuria. Geeleissä oli silmämääräisesti enemmän partikkeleita, joiden todettiin toisten näytteiden kokeissa vaikuttavan heikentävästi geelin rakenteeseen. Partikkelit voivat myös olla viite siitä, ettei liukeneminen ole tapahtunut kunnolla. Toisaalta korkeampi loppuviskositeetti RVA:ssa antoi ymmärtää, että beetaglukaani oli ollut paremmin liuennutta etanolin kanssa valmistetuissa näytteissä. Etanolin vaikutuksista ei tämän tutkimuksen perusteella voida todeta mitään varmaa.

3.3.7 Beetaglukaanin liuottamiseen käytetyn ajan vaikutus

Tutkimuksessa liuotettiin beetaglukaania eri tavoin myös ilman tärkkelystä. Tutkimuksen alkupuolella suoritetuissa kokeissa havaittiin beetaglukaanin geelittyvän hieman paremmin, kun se oli liuotettu 37 °C:een lämpötilassa verrattuna näytteeseen, joka oli liuotettu 85 °C:een lämpötilassa, molemmat noin kahden tunnin ajan. Jo aiemmin esitetty teoria beetaglukaanin optimaalisesta liukenemisestä geelitymisen suhteen voisi sopia selittämään myös tämän tutkimuksen tuloksia. Lähtökohtaisesti odotettiin, että mitä paremmin beetaglukaani on saatu liukenemaan, sitä vahvempia geelejä saadaan. Tulokset osoittivat päinvastaista, paremmin liuennut beetaglukaani johti heikomman geelin muodostumiseen. Kun beetaglukaania liuotettiin ilman etanolia lämmittäen 37 °C:een asti 15 minuutin ajan, muodostui hieman vahvempi rakenne verrattuna näytteisiin, jotka oli esiliuotettu etanoliin ja lämmitetty kahden tunnin ajan.

3.3.8 Tutkimuksen tulosten merkitys

Molekyylien välille voi muodostua vuorovaikutuksia, jolloin molekyylit joko vetävät toisiaan puoleensa, ja muodostavat kompleksin tai hylkivät toisiaan, ja aiheuttavat faasiseparaation. Vuorovaikutuksiin ei yleensä lasketa esimerkiksi polymeeriketjujen kietoutumista toistensa kanssa. Sen sijaan erimerkkisiä sähköisiä varauksia kantavien molekyylien välillä olevat heikot sidokset voidaan katsoa vuorovaikutuksiksi. Beetaglukaanin ja tärkkelyksen sisältävien näytteiden viskositeetin suureneminen sekä geelirakenteen vahvuus puoltavat vuorovaikutusten olemassaoloa. Toisaalta se, että liuottamalla beetaglukaani paremmin ei saatu aikaan vahvempaa geeliä ei puhu vahvojen vuorovaikutusten löytymisen puolesta.

Tämän tutkimuksen kokeissa huomattiin, että vain noin kymmenen minuutin lämmittämisellä vedessä beetaglukaani liukenee riittävästi muodostaakseen rakennetta. Kyseinen tulos ei liity niinkään beetaglukaanin ja tärkkelyksen vuorovaikutuksiin, mutta osoittaa sen, että beetaglukaanin käyttäytymisen tunteminen on olennainen osa vuorovaikutusten tutkimista. Beetaglukaanin ominaisuuksia tulisi tutkia lisää, erityisesti osittaisen liukenemisen vaikutusta geelitymiseen.

Näiden tulosten pohjalta voitaisiin tutkia, onko beetaglukaanin lisäämisellä vaikutusta gluteenittoman leivän rakenteen säilymiseen pehmeänä pidempiä aikoja. Koska leivän rakenteen kovettuminen liittyy tärkkelykseen, olisi tärkeää optimoida beetaglukaanin määrä

tärkkelyksen määrän suhteen. Tuloksia voitaisiin hyödyntää paistoajan optimoinnissa, ja paistoajan vaikutusta beetaglukaania sisältävän leivän terveysvaikutuksiin voisi tutkia.

4 PÄÄTELMÄT

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää, onko beetaglukaanin ja tärkkelyksen välillä vuorovaikutuksia, ja jos on, niin millaisia ne ovat. Beetaglukaani ja tärkkelys vaikuttivat toistensa käyttäytymiseen jo muutaman minuutin aikana yhdessä kuumentamisen alkamisesta. RVA:lla valmistettujen beetaglukaania ja tärkkelystä sisältävien näytteiden loppuviskositeetit olivat todella suuria, mikä voi johtua beetaglukaanin pitoisuuden suurenemisesta paikallisesti jatkuvassa faasissa tilavuuden pienentyessä, kun tärkkelysjuväset paisuivat.

Lisättäessä etanolia beetaglukaaniin ennen tärkkelyksen ja veden lisäämistä sekä kuumennusta beetaglukaanin liuottamiseksi perusteellisemmin, saavutettiin vielä suurempi loppuviskositeetti. Geelirakenne jäi kuitenkin etanolin avulla valmistetuissa näytteissä heikommaksi kuin ilman etanolia valmistetuilla näytteillä. Ainakin osasyynä on saattanut olla geelissä olevat näkyvät partikkelit, joiden todettiin heikentävän geeliä.

Pitkään liuotettu beetaglukaani ja tärkkelys muodostivat yhtä vahvan geelin erikseen liuotettuina ja sitten sekoitettuna kuin yhdessä liuotettuina. Sen sijaan lyhyen liuotusajan seurauksena beetaglukaani ja tärkkelys muodostivat vahvimman geelin, mitä tutkimuksessa nähtiin. Vahvimman geelirakenteen muodostuminen voi liittyä beetaglukaanin osittaiseen liukenemiseen, minkä on havaittu aiemmissa tutkimuksissa olevan edellytys laimean beetaglukaaniliuoksen geeliytymiselle.

Työn aikana ei selvinnyt, onko beetaglukaanin ja tärkkelyksen välillä varsinaisia vuorovaikutuksia. Beetaglukaanin ja tärkkelyksen mahdollisten heikkojen vuorovaikutuksien mekanismien tunteminen voisi olla hyödyllistä, joten lisätutkimuksia aiheesta tarvitaan. Faasiseparoitumista tutkimalla voitaisiin saada lisää tietoa beetaglukaanin ja tärkkelyksen vuorovaikutuksista.

5 LÄHTEET

[AACC] American Association of Cereal Chemists. 1997. AACC method 76-21.02. General pasting method for wheat or rye flour or starch using the rapid visco analyzer. Teoksessa: Approved methods of the American Assn. of Cereal Chemists. 4. p. St. Paul, Minnesota: AACC.

Ahmad A, Anjum FM, Zahoor T, Nawaz H, Ahmed Z. 2010. Extraction and characterization of β -D-glucan from oat for industrial utilization. *International Journal of Biological Macromolecules* 46:304-309.

Ai Y, Jane J-I. 2014. Review: Gelatinization and rheological properties of starch. *Starch/Stärke* 67:213-224.

Alloncle M, Lefebvre J, Llamas G, Doublier JL. 1989. A rheological characterization of cereal starch-galactomannan mixtures. *Cereal Chem.* 66(2):90-93.

Andersson AAM, Armö E, Grangeon E, Fredriksson H, Andersson R, Åman P. 2004. Molecular weight and structure units of (1-3, 1-4)- β -glucans in dough and bread made from hull-less barley milling fractions. *Journal of Cereal Science* 40:195-204.

Araujo MA, Cunha AM, Mota M. 2004. Enzymatic degradation of starch-based thermoplastic compounds used in prostheses: identification of the degradation products in solution. *Biomaterials* 25(13):2687-2693.

Ashogbon AO, Akintayo ET. 2014. Recent trend in the physical and chemical modification of starches from different botanical sources: A review. *Starch/Stärke* 66:41-57.

Autio K. 2006. Functional aspects of cereal cell-wall polysaccharides. Teoksessa: *Carbohydrates in Food*. Eliasson A-C, toim. 2. p. Boca Raton FL, USA: CRC Press. s 167-207.

Autio K. 1990. Rheological and microstructural changes of oat and barley starches during heating and cooling. *Food Structure* 9(4):297-304.

Battilana P, Ornstein K, Minehira K, Schwarz J, Acheson K, Schneiter P, Burri J, Jequier E, Tappy L. 2001. Mechanisms of action of β -glucan in postprandial glucose metabolism in healthy men. *European Journal of Clinical Nutrition* 55:327-333.

Bhatty RS. 1992. Total and extractable β -glucan contents of oats and their relationship to viscosity. *Journal of Cereal Science* 15:185-192.

Bourne MC. 2002. Texture, viscosity and food. Teoksessa: *Food texture and viscosity: concept and measurement*. 2. p. Bourne MC, toim. Elsevier Science & Technology, London, UK. s 1-32.

Brand-Miller JC, Holt SHA, Pawlak DB, McMillan J. 2002. Glycemic index and obesity. *American Clin Nutr* 76(suppl):281S-5S.

Brennan C. 2004. Effects of β -glucan fractions from barley on structure, texture, sensory characteristics and nutritional value of processed cereal foods. University of Plymouth 108s. Saatavilla https://cereals.ahdb.org.uk/media/336053/346_complete_final_report.pdf. Vierailtu 13.4.2018.

Brennan C, Cleary L. 2005. The potential use of cereal (1-3,1-4)- β -D-glucans as functional food ingredients. *Journal of Cereal Science* 42:1-13.

Buliga GS, Brant DA. 1986. The sequence statistics and solution conformation of a barley (1-3,1-4)- β -D-glucan. *Carbohydrate research* 157:139-156.

Burkus Z, Temelli F. 2005. Rheological properties of barley β -glucan. *Carbohydrate Polymers* 59:459-465.

Burrell MM. 2003. Starch: the need for improved quality or quantity – an overview. *Journal of Experimental Botany* 54(382):451-456.

Böhm N, Kulicke W-M. 1999a. Rheological studies of barley (1-3)(1-4)- β -glucan in concentrated solution: investigation of the viscoelastic flow behaviour in the sol-state. *Carbohydrate Research* 315:293-301.

Böhm N, Kulicke W-M. 1999b. Rheological studies of barley (1-3)(1-4)- β -glucan in concentrated solution: mechanistic and kinetic investigation of the gel formation. *Carbohydrate Research* 315:302-311.

Chantaro P, Pongsawatmanit R. 2010. Influence of sucrose on thermal and pasting properties of tapioca starch and xanthan gum mixtures. *Journal of Food Engineering* 98:44-50.

Chung H-J, Liu Q, Pauls KP, Fan MZ, Yada R. 2008. In vitro starch digestibility, expected glycemic index and some physicochemical properties of starch and flour from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in Canada. *Food Research International* 41:869-875.

Copeland L, Blazek J, Salman H, Chiming Tang M. 2009. Form and functionality of starch. *Food Hydrocolloids* 23:1527-1534.

Corezzi S, Fioretto D, Sciortino F. 2012. Chemical and physical aggregation of small functionality particles. *Soft Matter* 8:11207-11216.

Czuchajowska Z, Paszczynska B, Pomeranz Y. 1992. Functional properties of psyllium in wheat-based products. *Cereal Chem.* 69(5):516-520.

Doublier J-L, Wood PJ. 1995. Rheological properties of aqueous solutions of (1-3)(1-4)- β -D-glucan from oats (*Avena sativa* L.). *Cereal Chem* 72:335-340.

Eliasson A-C. 1986. Viscoelastic behaviour during the gelatinization of starch II. Effects of emulsifiers. *Journal of Texture Studies* 17:357-375.

FDA, Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services (HHS). 1997. Food labeling: Health claims; Oats and coronary heart disease. Final Rule. Fed Regist 62(15):3584–3601.

Feng R, Du S, Chen Y, Zhang W, Na G, Li Y, Sun C. 2015. High carbohydrate intake from starchy foods is positively associated with metabolic disorders: a cohort study from a Chinese population. *Scientific Reports* 5(16919):1-8.

Fischer P. 2015. Rheological properties of food. Teoksessa: Nollet LML, Toldra F, toim. *Handbook of Food Analysis*. 3. p. Boca Raton, FL, USA: CRC Press. s 21-38.

Fulcher RG, Setterfield G, McCully ME, Wood PJ. 1977. Observations on the aleurone layer. II fluorescence microscopy of the aleurone-sub-aleurone junction with emphasis on possible β -1,3-glucan deposits in barley. *Aust. J. Plant Physiol.* 4:917-28.

Gamel TH, Abdel-Aal E-SM, Ames N, Duss R, Tosh SM. 2014. Enzymatic extraction of beta-glucan from oat bran cereals and oat crackers and optimization of viscosity measurement. *Journal of Cereal Science* 59:33-40.

Gao Z, Fang Y, Cao Y, Liao H, Nishinari K, Phillips GO. 2017. Hydrocolloid-food component interactions. *Food Hydrocolloids* 68:149-156.

Gunaratne A, Corke H. 2016. Starch: Analysis of Quality. *Encyclopedia of Food Grains*, second edition 3:202-212.

Hardy K, Brand-Miller J, Brown K, Thomas M, Copeland L. 2015. The Importance of Dietary Carbohydrate in Human Evolution. *The Quarterly Review of Biology* 90(3):251-268.

Hazelton JL, Walker CE. 1996. Temperature of liquid contents in RVA cans during operation. *Cereal Chem.* 73(2):284-289.

Hoover R, Senanayake SPJN. 1996. Composition and physicochemical properties of oat starches. *Food Research International* 29(1):15-26.

Hrmova M, Fincher GB. 2001. Structure-function relationships of β -D-glucan endo- and exohydrolases from higher plants. *Plant Molecular Biology* 47:73-91.

Izydorczyk M, Macri L, MacGregor A. 1998. Structure and physicochemical properties of barley non-starch polysaccharides – II. Alkali-extractable β -glucans and arabinoxylans. *Carbohydrate Polymers* 35:259-269.

Izydorczyk MS, Lagasse SL, Hatcher DW, Dexter JE, Rossnagel BG. 2005. The enrichment of asian noodles with fiber-rich fractions derived from roller milling of hull-less barley. *J Sci Food Agric* 85:2094-2104.

Jamilah B, Mohamed A, Abbas KA, Abdul Rahman R, Karim R, Hashim DM. 2009. Protein-starch interaction and their effect on thermal and rheological characteristics of a food system: A review. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 7(2):169-174.

Jaskari J, Henriksson K, Nieminen A, Suortti T, Salovaara H, Poutanen K. 1995. Effect of hydrothermal and enzymic treatments on the viscous behavior of dry- and wet-milled oat brans. *Cereal Chem.* 72(6):625-631.

Jensen E. 2012. Types of Imaging, part 2: An overview of fluorescence microscopy. *The Anatomical Record* 295:1621-1627.

Jiang Z, Pulkkinen M, Wang Y, Lampi A-M, Stoddard FL, Salovaara H, Piironen V, Sontag-Strohm T. 2016. Faba bean flavour and technological property improvement by thermal pre-treatments. *LWT – Food Science and Technology* 68:295-305.

Johansson L. 2006. Structural analyses of (1-3)(1-4)- β -D-glucan of oats and barley (väitöskirja). Helsinki: University of Helsinki 85 s. Saatavilla <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/maa/skemi/vk/johansson/structur.pdf>. Vierailtu 12.4.2018.

Johansson L, Tuomainen P, Ylinen M, Ekholm P, Virkki L. 2004. Structural analysis of water-soluble and – insoluble β -glucans of whole-grain oats and barley. *Carbohydrate Polymers* 58:267-274.

Kandra L. 2003. α -amylases of medical and industrial importance. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* 666-667:487-498.

Kim H, White P. 2012. Interactional Effects of β -Glucan, Starch, and Protein in Heated Oat Slurries on Viscosity and In Vitro Bile Acid Binding. *J Agric Food Chem* 60:6217-6222.

Kivelä R. 2011. Non-enzymatic degradation of (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 4)- β -D-glucan in aqueous processing of oats (väitöskirja). Helsinki: University of Helsinki 78 s. Saatavilla <https://helda.helsinki.fi/handle/10138/27303>. Vierailtu 9.4.2018.

Kwong MGY, Wolever TMS, Brummer Y, Tosh SM. 2013. Attenuation of glycemic responses by oat β -glucan solutions and viscoelastic gels is dependent on molecular weight distribution. *Food Funct.* 4:401-408.

Lazaridou A, Biliaderis CG, Izydorczyk MS. 2003. Molecular size effects on rheological properties of oat β -glucans in solution and gels. *Food Hydrocolloids* 17:693-712.

Lazaridou A, Biliaderis CG, Micha-Screttas M, Steele BR. 2004. A comparative study on structure-function relations of mixed-linkage (1-3),(1-4) linear β -D-glucans. *Food Hydrocolloids* 18:837-855.

Lazaridou A, Biliaderis C. 2007. Molecular aspects of cereal β -glucan functionality: Physical properties, technological applications and physiological effects. *Journal of Cereal Science* 46:101-118.

Lazaridou A, Biliaderis C. 2009. Concurrent phase separation and gelation in mixed oat β -glucans/sodium caseinate and oat β -glucans/pullulan aqueous dispersions. *Food Hydrocolloids* 23:886-895.

- Lehtinen P, Kaukovirta-Norja A. 1986. Oat lipids, enzymes, and quality. Teoksessa: Webster FH, Wood PJ, toim. Oats: chemistry and technology. 2. p. AACC International Inc. St. Paul, Minnesota, USA. s 143-156.
- Li W, Cui SW, Wang Q, Yada RY. 2011. Studies of aggregation behaviours of cereal β -glucans in dilute aqueous solutions by light scattering: Part I. Structure effects. *Food Hydrocolloids* 25(2):189-195.
- Lim WJ, Liang YT, Seib PA, Rao CS. 1992. Isolation of oat starch from oat flour. *Cereal Chem.* 69(3):233-236.
- Lichtman J, Conchello J-A. 2005. Fluorescence microscopy. *Nature Methods* 2(12):910-919.
- MacDougall AJ, Rigby NM, Ring SG. 1997. Phase separation of plant cell wall polysaccharides and its implications for cell wall assembly. *Plant Physiol.* 114:353-362.
- MacGregor AW, Balance GM, Dushnicky L. 1989. Fluorescence microscopy studies on (1,3)-B-D-glucan in barley endosperm. *Food Microstructure* 8:235-244.
- Martinez M. Applications of the Rapid Visco Analyser (RVA) in the food industry: a broader view. Saatavilla <https://www.perten.com/Publications/Articles/Applications-of-the-Rapid-Visco-Analyser-RVA-in-the-Food-Industry-a-broader-view/>. Vierailtu 12.4.2018.
- Miller SS, Fulcher RG. 1994. Distribution of (1-3),(1-4)- β -D-glucan in kernels of oats and barley using microspectrofluorometry. *Cereal Chem.* 71(1):64-68.
- Miri T. 2011. Viscosity and Oscillatory Rheology. Teoksessa: Practical Food Rheology: An Interpretive Approach. Norton IT, toim. Fotios Spyropoulos and Philip Cox. Blackwell Publishing Ltd. s 7-28.
- Moschakis T, Lazaridou A, Biliaderis C. 2014. A micro- and macro-scale approach to probe the dynamics of sol-gel transition in cereal β -glucan solutions varying in molecular characteristics. *Food Hydrocolloids* 42:81-91.
- Mua J-P, Jackson DS. 1995. Gelatinization and solubility properties of commercial oat starch. *Starch/stärke* 47(1):2-7.
- Mäkelä N, Maina NH, Vikgren P, Sontag-Strohm T. 2017. Gelation of cereal β -glucan at low concentrations. *Food Hydrocolloids* 73:60-66.
- Mäkelä N, Sontag-Strom T, Maina NH. 2015. The oxidative degradation of barley β -glucan in the presence of ascorbic acid or hydrogen peroxide. *Carbohydrate Polymers* 123:390-395.
- Mäkeläinen H, Anttila H, Sihvonen J, Hietanen R-M, Tahvonen R, Salminen E, Mikola M, Sontag-Strohm T. 2007. The effect of β -glucan on the glycemic and insulin index. *European Journal of Clinical Nutrition* 61:779-785.

Orford PD, Ring SG, Carroll C, Miles MJ, Morris VJ. 1987. The effect of concentration and botanical source on the gelation and retrogradation of starch. *J. Sci. Food Agric.* 39:169-177.

Othman RA, Moghadasian MH, Jones JH. 2011. Cholesterol-lowering effects of oat β -glucan. *Nutrition Reviews* 69:299-309.

Ott M, Hester EE. 1965. Gel formation as related to concentration of amylose and degree of starch swelling. *Cereal Chem.* 42:476-484.

Ovecka M, Bahaji A, Munoz FJ, Almagro G, Ezquer I, Baroja-Fernandez E, Li J, Pozueta-Romero J. 2012. A sensitive method for confocal fluorescence microscopic visualization of starch granules in iodine stained samples. *Plant Signaling & Behavior* 7(9):1146-1150.

Parrish FW, Perlin AS, Reese ET. 1960. Selective enzymolysis of poly- β -D-glucans, and the structure of the polymers. *Can. J. Chem.* 38:2094-2104.

Phimolsiripol Y, Siripatrawan U, Henry CJK. 2011. Pasting behaviour, textural properties and freeze-thaw stability of wheat flour-crude malva nut (*Scaphium scaphigerum*) gum system. *Journal of Food Engineering* 105:557-562.

Pongsawatmanit R, Srijunthongsiri S. 2008. Influence of xanthan gum on rheological properties and freeze-thaw stability of tapioca starch. *Journal of Food Engineering* 88:137-143.

Raigond P, Ezekiel R, Raigond B. 2015. Resistant starch in food: a review. *J Sci Food Agric* 95:1968-1978.

Ring SG. 1985. Some studies on starch gelation. *Starch/Stärke* 37:80-83.

Skendi A, Biliaderis C, Lazaridou A, Izydorczyk M. 2003. Structure and rheological properties of water soluble β -glucans from oat cultivars of *Avena sativa* and *Avena bysantina*. *Journal of Cereal Science* 38:15-31.

Souza P, Oliveira e Magalhaes P. 2010. Application of microbial α -amylase in industry – a review. *Brazilian Journal of Microbiology* 41:850-861.

Tester R, Karkalas J, X Qi. 2004. Starch - composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science* 39:151-165.

Tolstoguzov V. 2003. Review: Some thermodynamic considerations in food formulation. *Food Hydrocolloids* 17:1-23.

Tosh SM, Wood PJ, Wang Q. 2003. Gelation characteristics of acid-hydrolyzed oat beta-glucan solutions solubilized at a range of temperatures. *Food Hydrocolloids* 17:523-527.

Tosh S, Brummer Y, Wood P, Wang Q, Weisz J. 2004. Evaluation of structure in the formation of gels by structurally diverse (1-3)(1-4)- β -D-glucans from four cereal and one lichen species. *Carbohydrate Polymers* 57:249-259.

Ulmius M, Önning G, Nilsson L. 2012. Solution behavior of barley β -glucan as studied with asymmetrical flow field-flow fractionation. *Food Hydrocolloids* 26:175-180.

Vaikousi H, Biliaderis CG, Izydorczyk MS. 2004. Solution flow behavior and gelling properties of water-soluble barley (1-3)(1-4)- β -glucans varying in molecular size. *Journal of Cereal Science* 39:119-137.

Vamadevan V, Bertoft E. 2015. Structure-function relationships of starch components. *Starch/Stärke* 67:55-68

Villegas R, Liu S, Gao Y-T, Yang G, Li H, Zheng W, Shu XO. 2007. Prospective study of dietary carbohydrates, glycemic index, glycemic load, and incidence of type 2 diabetes mellitus in middle-aged Chinese women. *Arch Intern Med* 167(21):2310-2316.

Virtanen T, Autio K, Suortti T, Poutanen K. 1992. Heat-induced changes in native and acid-modified oat starch pastes. *Journal of cereal science* 17:137-145.

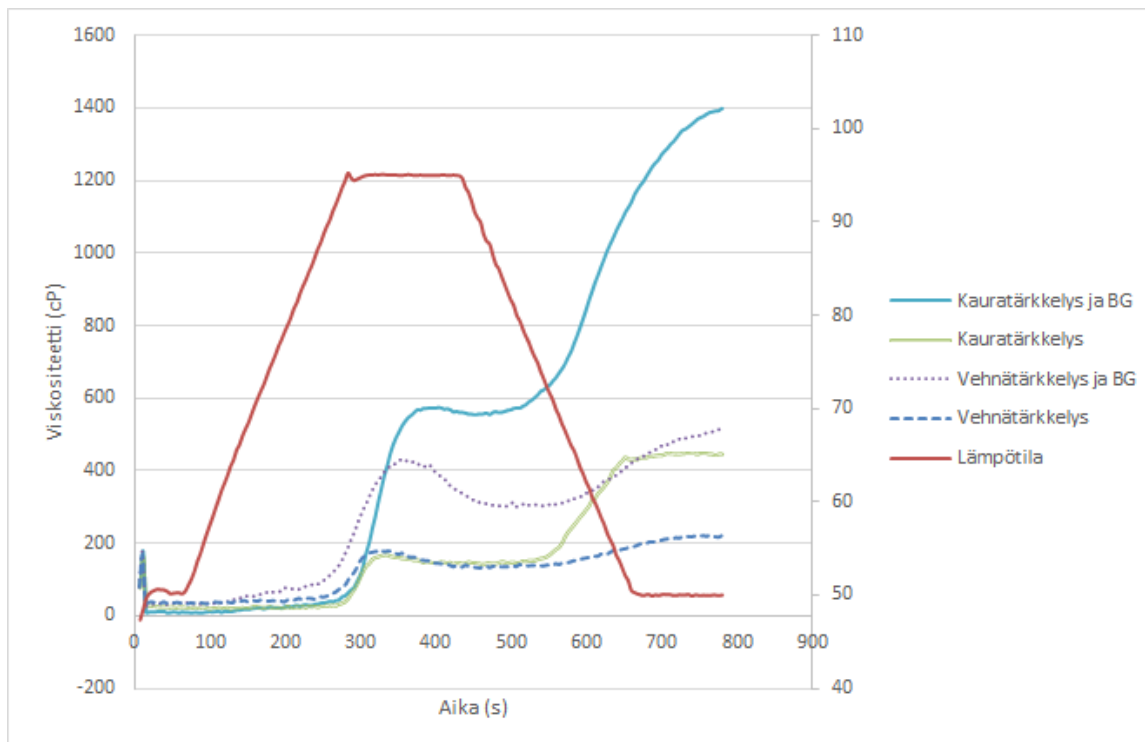
Vårum K, Smidsrod O, Brant D. 1992. Light scattering reveals micelle-like aggregation in the (1-3)(1-4)- β -D-glucans from oat aleurone. *Food Hydrocolloids* 5(6):497-511.

Wickström Jansson K, Lindahl L. 1991. *Journal of Food Science* 56(6):1685-1689.

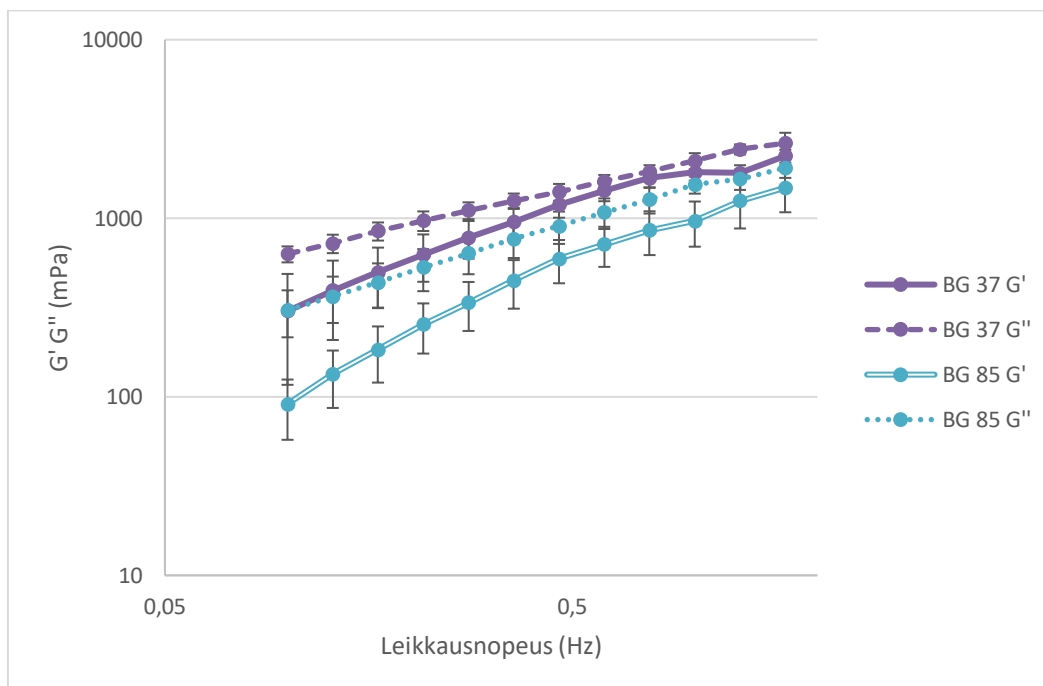
Zhou M, Robards K, Glennie-Holmes M, Helliwell S. 1998. Structure and pasting properties of oat starch. *Cereal Chem.* 75(3):273-281.

Åman P, Rimsten L, Andersson R. 2004. Molecular weight distribution of β -glucan in oat-based foods. *Cereal Chem.* 81(3):356-360.

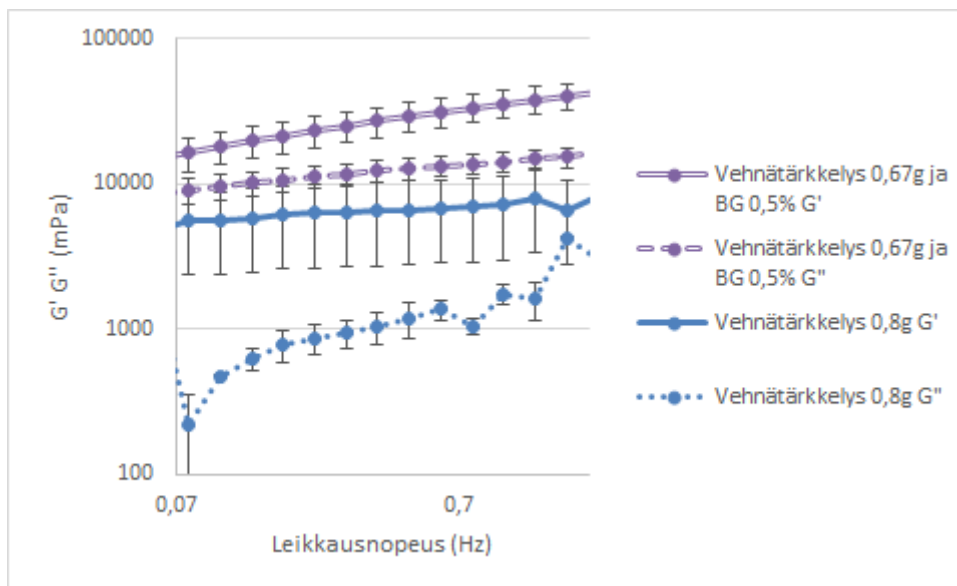
LIITTEET



Liite 1. Vehnätärkkelyksen, kauratärkkelyksen, vehnätärkkelyksen ja beetaglukaanin kuivaseoksen sekä kauratärkkelyksen ja beetaglukaanin kuivaseoksen viskositeetti RVA:lla.



Liite 2. Lämpötiloissa 37 °C ja 85 °C kahden tunnin ajan liuotetun beetaglukaanin viskoelastiset ominaisuudet leikkausnopeuden funktiona. Kummassakaan lämpötilassa liuotettu beetaglukaani ei muodostanut geeliä.



Liite 3. Laimeasta vehnätärkkelysliuoksesta valmistetun näytteen ja beetaglukaanilla täydennetyn geelin viskoelastiset ominaisuudet leikkausnopeuden funktiona. Täydentämällä laimea vehnätärkkelysliuos 0,5 %:lla beetaglukaania saatiin aikaan geeli.